

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFET DU PEPTIDE APPARENTÉ À LA PARATHORMONE
SUR LA DIFFÉRENCIATION ET LE TRANSPORT CALCIQUE
DES TROPHOBLASTES HUMAINS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
ISABELLE POUDRIER

MARS 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article **11** du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Julie Lafond, de m'avoir permis de réaliser ce projet qui me tenait à cœur.

Merci à mes collègues du laboratoire de physiologie materno-fœtale. Un merci tout spécial à Aline Conceição, sans qui cette expérience n'aurait pas été la même !

Merci à mes collègues de BioMed pour leur aide tant au niveau technique que leur apport intellectuel. Ici, j'ai pu faire des rencontres inoubliables...

Merci à toute ma famille et mes amies et en particulier à Maman et Brigitte. Merci pour votre support moral et pour avoir essayé de comprendre en quoi consistait ce projet !

Merci à M. Denis Flipo pour son aide lors de la mise au point et la réalisation de certaines techniques.

Merci aux infirmières du Centre des naissances du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) St-Luc.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I.....	3
ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
1.1 Le placenta	3
1.1.1 La placentation	4
1.1.2 Le syncytiotrophoblaste (ST)	6
1.1.3 Conditions pathologiques lors de la grossesse	8
1.2 Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP).....	10
1.2.1 Caractéristiques de la PTHrP.....	10
1.2.2 PTH1R.....	11
1.2.3 Rôles physiologiques de la PTHrP	12
1.2.4 La PTHrP et la grossesse.....	12
1.2.5 Implication de la PTHrP dans le transport du calcium à travers le placenta ...	13
1.2.6 Implication de la PTHrP dans la différenciation des trophoblastes.....	14
1.2.7 La PTHrP et les conditions pathologiques lors de la grossesse.....	14
1.3 Les protéines activées par des mitogènes (MAPK).....	15
1.3.1 Caractéristiques des MAPKs	15
1.3.2 La famille des ERKs.....	17
1.3.3 La famille des p38s.....	19

1.3.4	Les MAPKs dans la différenciation des trophoblastes	20
1.4	Le transport du calcium dans le placenta	21
1.4.1	Les canaux transitoires à potentiel vanilloïdes (TRPV5 et 6)	22
1.4.2	Les protéines liant le calcium (CaBPs)	24
1.4.3	Les pompes à calcium de la membrane plasmique (PMCA).....	27
1.4.4	Les échangeurs sodium/calcium (NCX).....	29
1.5	Hypothèses de travail	30
CHAPITRE II.....		32
MÉTHODOLOGIE		32
2.1	Extraction des trophoblastes humains	32
2.2	Mise au point du milieu de culture	33
2.2.1	Sécrétion de hCG par les trophoblastes.....	33
2.2.2	Immunofluorescence	34
2.3	Effet de la PTHrP (fragment 1-34) sur la différenciation cellulaire.....	34
2.3.1	Essai de cytotoxicité.....	35
2.3.2	Extraction de protéines.....	35
2.3.3	Analyse par immunobuvardage (Western Blot).....	36
2.3.4	Effet de la PTHrP (1-34) et d'un inhibiteur de MAPK (PD98059) sur l'activation de ERK1/2.....	37
2.4	Effet de la PTHrP sur le transport calcique des trophoblastes humains.....	37
2.4.1	Captation de calcium	37
2.4.2	Analyse par immunobuvardage (Western Blot).....	38
2.4.3	Extraction d'ARN, transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel	39
2.5	Analyses statistiques.....	40

CHAPITRE III	41
RÉSULTATS	41
3.1 Effet du milieu de culture sans sérum sur la différenciation	41
3.2 Viabilité cellulaire	44
3.3 Effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation des trophoblastes humains	45
3.4 Effet de la PTHrP (1-34) sur l'activation des MAPKs ERK 1/2 et p38	49
3.4.1 Effet de la PTHrP sur l'activation de p38	49
3.4.2 Effet de la PTHrP sur l'activation de ERK 1/2	51
3.5 Effet de la PTHrP (1-34) sur le transport calcique des trophoblastes humains	55
3.5.1 Modulation génique des protéines impliquées dans le transport du calcium ..	56
3.5.2 Expression des protéines impliquées dans le transport du calcium	62
CHAPITRE IV	67
DISCUSSION	67
4.1 Milieu de culture	67
4.2 Viabilité cellulaire	69
4.3 Effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation des trophoblastes humains	69
4.4 Effet de la PTHrP (1-34) sur le transport de calcium	72
CHAPITRE V	76
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	76
5.1 Conclusions	76
5.2 Perspectives	77
BIBLIOGRAPHIE	79

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	La placentation et les membranes embryonnaires	4
1.2	Formation d'une villosité choriale	6
1.3	Structure du gène de la PTHrP	11
1.4	Voies de signalisation des MAPKs et leurs réponses biologiques	17
1.5	Cascade d'activation de ERK1 et ERK2	19
1.6	Schématisation du transport de calcium à travers le syncytiotrophoblaste	24
1.7	Structure des pompes à calcium de la membrane plasmique (PMCA)	29
3.1	Effet de différents milieux de culture sur la morphologie cellulaire des trophoblastes humains au quatrième jour de culture <i>in vitro</i>	39
3.2	Effet de différents milieux de culture sur la sécrétion hormonale de gonadotropine chorionique humaine (hCG)	40
3.3	Effet de la PTHrP (1-34) sur la viabilité cellulaire	41
3.4	Effet de la PTHrP (1-34) sur la morphologie cellulaire des trophoblastes humains au quatrième jour de culture <i>in vitro</i>	43
3.5	Effet de la PTHrP (1-34) sur la sécrétion hormonale de gonadotropine chorionique humaine (hCG)	44
3.6	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'activation de p38 dans les trophoblastes humains au cours de la culture cellulaire	46
3.7	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'activation de ERK1/2 dans les trophoblastes humains au cours de la culture cellulaire	48
3.8	Effet de la PTHrP (1-34) et de l'inhibiteur PD98059 sur l'activation de ERK1/2 dans les trophoblastes humains en culture	50
3.9	Effet de la PTHrP (1-34) sur la captation du calcium par les syncytiotrophoblastes	52
3.10	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de TRPV5 dans les cellules trophoblastiques humaines	53
3.11	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de TRPV6 dans les cellules trophoblastiques humaines	54
3.12	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de TCTP dans les cellules trophoblastiques humaines	55
3.13	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de CaBP9k dans les cellules trophoblastiques humaines	56
3.14	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de PMCA1 dans les cellules trophoblastiques humaines	57
3.15	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de PMCA4 dans les cellules trophoblastiques humaines	58
3.16	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine TRPV6 dans les cellules trophoblastiques humaines	59
3.17	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine TCTP dans les cellules trophoblastiques humaines	60

3.18	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine PMCA1/4 dans les cellules trophoblastiques humaines	61
3.19	Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine PMCA2 dans les cellules trophoblastiques humaines	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
2.1	Concentration finale des éléments retrouvés dans le SITE-3 (Sigma)	31
2.2	Amorces sens et anti-sens des gènes codant pour les protéines impliquées dans le transport du calcium	38

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25-(OH)₂D₃ : vitamine D₃
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
BBM : membrane en bordure en brosse
BPM : membrane basale plasmique
Ca²⁺ : calcium
CaBP : «calcium binding protein» (protéine liant le calcium)
CaBP28k : «calcium binding protein 28k» (protéine liant le calcium 28k)
CaBP9k : «calcium binding protein 9k» (protéine liant le calcium 9k)
CaM : calmoduline
CSF-1 : «colony stimulating factor 1» (facteur 1 stimulant la croissance des colonies)
CT : cytotrophoblaste
EGF : «epidermal growth factor» (facteur de croissance épidermal)
ERK : «extracellular signal-regulated kinase» (kinase régulée par les signaux extra-cellulaires)
FBS : «fetal bovine serum» (sérum de veau fœtal)
hCG : «human chorionic gonadotropin» (gonadotropine chorionique humaine)
hPL : «human placental lactogen» (lactogène placentaire humaine)
LDH : lactate déhydrogénase
MAPK : «mitogen-activated protein kinase» (protéine kinase activée par des mitogènes)
M-CSF : «macrophage colony stimulating factor», (facteur stimulant la croissance des colonies de macrophages)
MMP : métalloprotéinases
NCX : «Na⁺/Ca²⁺ exchanger» (échangeur sodium/calcium)
PE : pré-éclampsie
PGH : «placental growth hormone», (hormone de croissance placentaire)
PKA : protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC : protéine kinase dépendante du calcium
PMCA : «plasma membrane calcium ATPase» (pompe à calcium de la membrane plasmique)
PTH : parathormone
PTH1R : récepteur 1 de la parathormone
PTHrP : «parathyroid hormone related protein», (peptide apparenté à la parathormone)
RCIU : retard de croissance intra-utérin
RCPG : récepteur couplé aux protéines G
ST : syncytiotrophoblaste
TCTP : «translationally controlled tumor protein» (protéine tumorale contrôlée par la traduction)
TGC : «trophoblast giant cell» (cellule géante trophoblastique)
TRP : «transient receptor potential» (canaux transitoires à potentiel)
TRPV : «transient receptor potential vanilloid» (canaux transitoires à potentiel vanilloïdes)

RÉSUMÉ

Lors de la grossesse, différentes complications peuvent survenir et amener des conséquences néfastes sur la santé de la mère et du fœtus. Par exemple, une malformation du placenta peut mener à des conditions pathologiques telles le retard de croissance intra-utérin ou la pré-éclampsie. Ces maladies semblent, respectivement, être causées par un désordre lors de la différenciation des cytotrophoblastes en syncytiotrophoblastes et une altération du transport de calcium de la mère au fœtus. Il est donc essentiel de découvrir les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent ces phénomènes afin de pouvoir, dans l'avenir, contrer le développement de telles conditions pathologiques. Chez la souris, le transport placentaire du calcium est dépendant du peptide apparenté à la parathormone (PTHrP) et son fragment N-terminal est impliqué dans le processus de différenciation des trophoblastes. Ainsi, cette étude a pour but premier de découvrir si la PTHrP (1-34) régule le transport calcique à travers les syncytiotrophoblastes humains. Par ailleurs, comme les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) ERK1/2 et p38 sont impliquées dans le processus de différenciation des trophoblastes humains, cette étude vise aussi à déterminer si la PTHrP (1-34) peut stimuler la différenciation des trophoblastes humains via ces deux MAPKs. Il a tout d'abord été nécessaire de mettre au point un milieu de culture sans sérum pour observer les effets directs de l'hormone sur la différenciation cellulaire. Les cellules trophoblastiques sont isolées à partir de placentas humains frais et cultivées dans un milieu de culture sans sérum où la PTHrP est ajoutée en concentrations croissantes. Tout d'abord, la cytotoxicité cellulaire des différents traitements a été mesurée. La différenciation des cellules trophoblastiques est ensuite mesurée de manière biochimique par le dosage de l'hormone hCG et, de manière morphologique, par l'observation de la fusion cellulaire. L'activation des voies de signalisation de ERK1/2 et p38 est observée par immunobuvardage de type Western et par la capacité de l'hormone de réactiver la voie de signalisation suite à son blocage par un inhibiteur spécifique. La captation du calcium par les syncytiotrophoblastes est étudiée à l'aide de calcium radiomarké ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), alors que l'effet de la PTHrP (1-34) sur les protéines impliquées dans le transport de l'ion calcique est étudié par PCR en temps réel et par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus indiquent que les différents traitements administrés aux cellules trophoblastiques ne causent pas de mortalité cellulaire. Par la suite, nous avons constaté qu'une forte concentration de l'hormone stimule la différenciation des cellules cytotrophoblastiques en syncytiotrophoblastes. Ce processus de différenciation semble se faire par la MAPK ERK1/2 puisque cette dernière est davantage activée en présence de PTHrP (1-34). De plus, le fragment N-terminal de la PTHrP est capable de réactiver cette MAPK suite à son inhibition. Par la suite, il a été possible de constater que la présence du fragment N-terminal de la PTHrP dans le milieu de culture des cellules trophoblastiques permet une augmentation significative de l'expression des protéines PMCA1 et 4 au premier jour de culture. Ainsi, une perturbation de la concentration de PTHrP (1-34) pourrait être un phénomène impliqué dans des conditions pathologiques lors de la grossesse chez la femme enceinte. Éventuellement, il serait donc intéressant d'observer l'effet de cette hormone sur la différenciation et le transport calcique des trophoblastes chez des femmes atteintes de pré-éclampsie ou dont l'enfant souffre de retard de croissance intra-utérin.

Mots clés : placenta, trophoblaste, PTHrP, différenciation, ERK1/2, p38, calcium

INTRODUCTION

Le développement adéquat du placenta est essentiel afin de nourrir convenablement le fœtus et de permettre sa croissance. Ainsi, un dysfonctionnement de cet organe peut donner lieu à des conditions pathologiques lors de la grossesse telles la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. Une des causes de la pré-éclampsie pourrait être une anomalie lors du transport de l'ion calcique. Le retard de croissance intra-utérin, quant à lui, semble davantage provenir d'un désordre lors de la différenciation des trophoblastes en syncytiotrophoblastes. Les causes exactes de ces conditions pathologiques sont encore inconnues, mais le peptide apparenté à la parathormone pourrait être impliqué dans l'étiologie de la pré-éclampsie et du retard de croissance intra-utérin (Curtis et al., 2000, Halhali et al., 2001, Strid et al., 2003).

Afin de mieux comprendre les processus moléculaires et cellulaires régissant la fusion des trophoblastes, nous avons tout d'abord étudié l'effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation de cellules trophoblastiques humaines isolées à partir de placentas. Comme les MAPKs ERK1/2 et p38 sont activées lors de l'initiation du processus de différenciation (Daoud et al., 2005), nous avons aussi évalué l'effet de cette hormone sur l'activation de ces voies de signalisation.

Par la suite, le rôle du fragment N-terminal de la PTHrP dans le transport transplacentaire du calcium a été évalué dans des cellules trophoblastiques humaines en culture. Bien que plusieurs études indiquent que la PTHrP (1-34) n'est pas impliquée dans le transport de cet ion à travers le placenta, ces dernières ont été effectuées chez la brebis (Care et al., 1990) et la souris (Kovacs and Kronenberg, 1997). Ainsi, nous désirions confirmer ou infirmer ces résultats pour les cellules trophoblastiques humaines. Des études sur l'effet de ce peptide sur la captation du calcium radiomarqué et sur l'expression de protéines impliquées dans le transport de l'ion calcique ont donc été effectuées.

Ce travail vise à découvrir si la PTHrP (1-34) agit sur la différenciation et le transport calcique des trophoblastes humains. Ultérieurement, cela pourrait aider à déterminer comment

se développent des conditions pathologiques lors de la grossesse telles la pré-éclampsie et le retard de croissance intra-utérin. En outre, l'implication de cette hormone dans ces conditions pathologiques pourrait, dans l'avenir, mener à la mise au point d'un traitement thérapeutique.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Chez les mammifères, le placenta est un organe transitoire indispensable puisqu'il nourrit, oxygène et épure l'embryon, puis le fœtus pour mener à bien son développement. L'importance de cet organe est aussi remarquable par le fait qu'un défaut de son développement ou une altération d'une de ses fonctions a un effet néfaste sur la croissance de l'embryon. De plus, le placenta possède de multiples fonctions endocrines. Chez l'espèce humaine, le placenta formé est dit de type hémochorial, c'est-à-dire que les cellules trophoblastiques sont en contact direct avec le sang maternel suite à la destruction de l'endomètre et des vaisseaux sanguins.

1.1 Le placenta

Il est tout d'abord important de bien comprendre comment se forme le placenta, cet organe permettant les échanges materno-fœtaux et la tolérance des antigènes paternels. Il existe plusieurs types de placentation chez les mammifères. Les différences sont retrouvées au niveau de la forme de l'organe, de l'arrangement géométrique des interdigitations entre les surfaces maternelles et fœtales et du nombre de couches cellulaires impliquées dans les échanges. Chez les rongeurs et les primates, on retrouve le placenta de type hémochorial. Dans ce cas, les trophoblastes envahissent l'endomètre utérin et détruisent les vaisseaux sanguins maternels. Ainsi, les trophoblastes entourant les villosités choriales sont en contact direct avec le sang maternel (figure 1.1) (Malassiné et al., 2000).

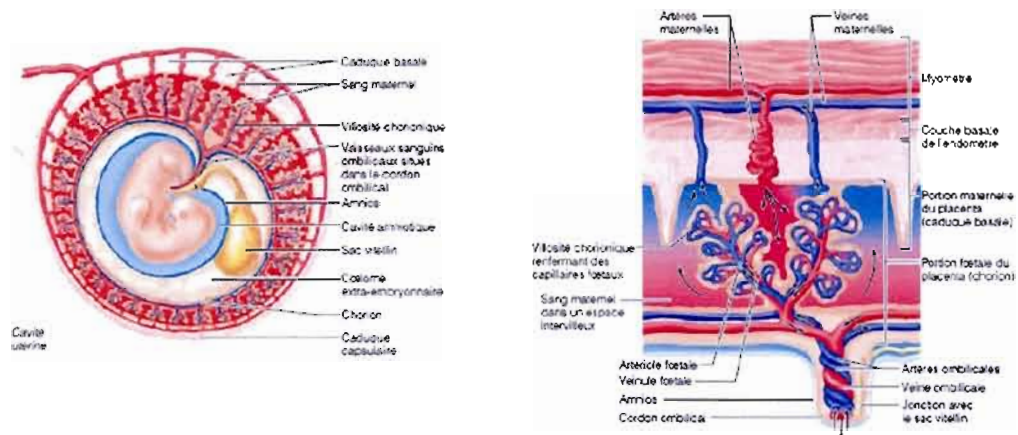


Figure 1.1 : La placentation et les membranes embryonnaires. Tiré de Marieb (2005).

1.1.1 La placentation

La création du placenta se fait par la coopération de deux organismes. En effet, les trophoblastes sont d'origine embryonnaire alors que l'endomètre est d'origine mat rnelle. Six jours après la fécondation, le blastocyste est composé de l'embryoblaste et d'une couche externe de cytotrophoblastes (CT) dérivée du trophoctoderme. Alors qu'ils s'approchent de l'endomètre utérin, les trophoblastes commencent à se différencier en syncytiotrophoblastes (ST) (Boyd and Hamilton, 1966) qui eux, possèdent une grande capacité d'invasion (figure 1.2A). Ces ST vont permettre l'adhésion du blastocyste à l'épithélium de l'endomètre, puis son enfouissement dans la muqueuse utérine, ce qui permet son implantation (Aplin, 1991, Cross et al., 1994). Plus précisément, l'attachement du blastocyste à la muqueuse utérine dépend des interactions entre des molécules d'adhésion comme les sélectines, les intégrines et les trophinines (Aplin and Kimber, 2004). Une fois que le blastocyste est implanté dans l'utérus, les trophoblastes portent alors le nom de CT.

Le trophoblaste donne naissance à une couche de mésoderme extra-embryonnaire qui se nomme chorion et à partir duquel se développent les villosités chorioniques. Par la suite, des lacunes apparaissent dans le syncytium, puis des CT migrent à travers ces syncytiums, formant une première ébauche des villosités choriales (figure 1.2B). Les lacunes seront ensuite remplies de liquides utérins tels le sang maternel, puis des cellules mésenchymateuses d'origine embryonnaire viendront s'intégrer à la villosité en formation. Environ trois semaines après la conception, la villosité choriale est complétée et est constituée d'un axe mésenchymateux, qui comprend les vaisseaux sanguins fœtaux, entouré d'une couche unicellulaire de CT qui fusionnent pour former la couche externe de ST qui se retrouvent en contact avec le sang maternel (figure 1.2C) (Alsat et al., 1999).

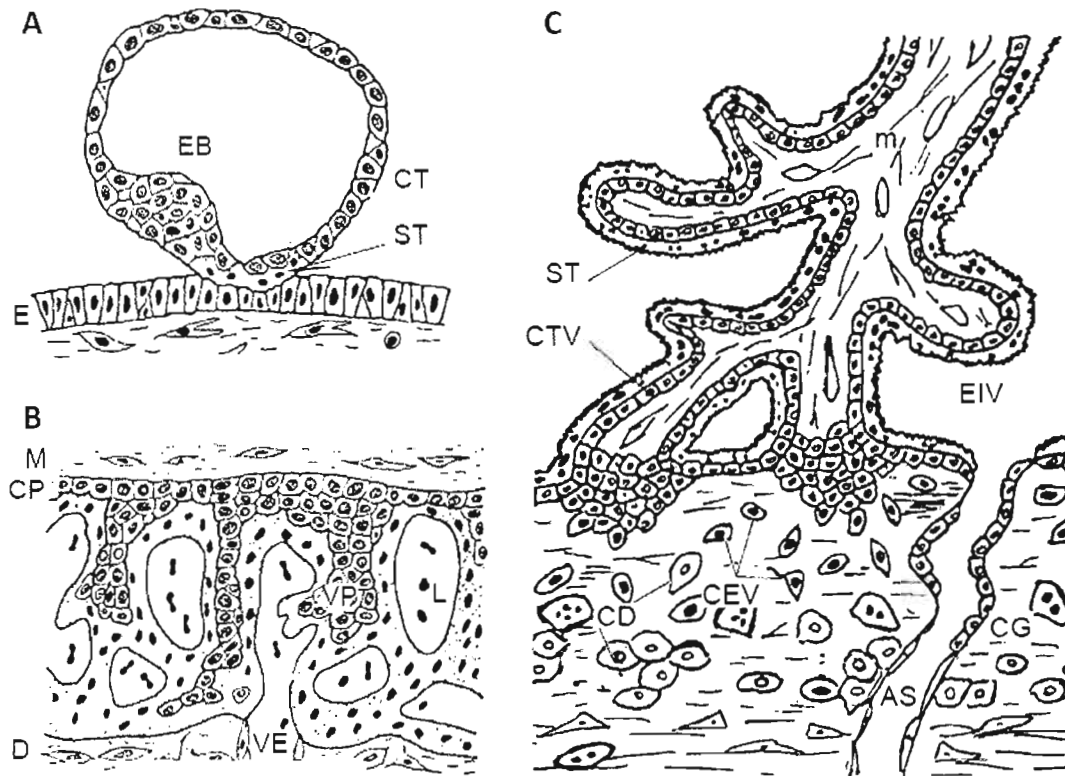


Figure 1.2 : Formation d'une villosité chorale

E : épithélium endométrial; EB : embryoblaste; CT : cytotrophoblaste; ST : syncytiotrophoblaste; M : mésoderme; CP : plaque chorale; L : lacune; VP : villosité primaire; VE : vaisseau endométrial; D : décidue; m : mésenchyme; CTV : CT villositaire; CEV : CT extravillous; EIV : espace intervillous; CD : cellule déciduale; CG : cellule géante; AS : artère spiralee. Tiré de Alsat et al. *Médecine/Science*, (1999) 15, 1236-1243.

1.1.2 Le syncytiotrophoblaste (ST)

Le CT est une cellule pluripotentielle pouvant donner naissance à différents types cellulaires tels le CT intermédiaire, le CT extravillous, le CT villositaire et le ST. En effet, les CT retrouvés à la base des villosités chorales vont devenir prolifératifs, puis vont migrer pour envahir l'endomètre utérin. Ces CT dits extravillous vont migrer spécifiquement vers les artères utérines pour dégrader la tunique élastique en paroi fibreuse offrant peu de résistance au flux sanguin maternel (Redman, 1997). Toutefois, les CT recouvrant les villosités chorales vont fusionner pour former les ST.

Le ST forme la barrière materno-fœtale. En plus d'assurer les échanges entre la mère et le fœtus grâce aux nombreuses microvillosités de sa membrane apicale, c'est le ST qui donne au placenta son activité endocrine. En effet, c'est ce type de cellules qui sécrètent des hormones stéroïdiennes telles la progestérone et l'œstrogène (Albrecht and Pepe, 1990) et des hormones peptidiques comme la gonadotrophine chorionique humaine (hCG), la lactogène placentaire humaine (hPL) et l'hormone de croissance placentaire (PGH) (Frankenne et al., 1990). La progestérone est sécrétée en quantité importante par le placenta. À terme, le placenta produit environ 300 mg de progestérone par jour (Petraglia et al., 1996). Cette hormone permet la relaxation du muscle utérin, alors que la PGH remplace progressivement l'hormone de croissance hypophysaire (GH) de la mère (Alsat et al., 1997). De plus, son expression par les CT extravilleux suggère que la PGH aurait un rôle dans le développement placentaire via un mécanisme autocrine ou paracrine (Alsat et al., 1997, Lacroix et al., 2002). La hCG, quant à elle, permet le déroulement adéquat de la grossesse puisqu'elle transforme le corps jaune cyclique en corps jaune gravidique, ce qui assure une sécrétion de progestérone par les ovaires durant les premières semaines de la grossesse. Puisque les ST sécrètent plus de 99% de ses hormones peptidiques dans la circulation maternelle, il est aisé de détecter la hCG dans le sang maternel, dès le dixième jour suite à l'ovulation. Toutefois, la sécrétion de hCG par les trophoblastes varie au cours de la grossesse puisqu'elle est plus importante au cours du premier trimestre (Bidart et al., 2000). Bien que la hPL soit sécrétée en quantité importante au cours de la grossesse (à terme, il y a une sécrétion de l'ordre du gramme par jour), son rôle n'est pas encore connu. Les ST sécrètent aussi des neuropeptides, des facteurs de croissance et des cytokines qui seraient impliqués dans le développement du placenta et dans la sécrétion hormonale (Petraglia et al., 1996, Senaris et al., 1997).

La fusion des CT en ST est stimulée par plusieurs facteurs tels l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Cronier et al., 1997, Keryer et al., 1998) et des facteurs de croissance comme le facteur de croissance des épidermes (EGF) (Morrish et al., 1987, Alsat et al., 1993), le facteur 1 stimulant la croissance des colonies (CSF-1) et le facteur stimulant la croissance des colonies de macrophages (M-CSF) (Saito et al., 1993). La hCG (Shi et al., 1993, Cronier et al., 1994) et le dexaméthasone (Cronier et al., 1998) causent aussi la formation de syncytium trophoblastique. De plus, ce mécanisme de fusion impliquerait

l'expression d'une protéine endogène d'origine rétrovirale, la syncytine (Blond et al., 2000, Mi et al., 2000). La présence de jonctions communicantes impliquant la connexine 43 et un apport adéquat en oxygène sont aussi requis pour la fusion cellulaire (Alsat et al., 1996).

À l'instar de la fusion observée *in vivo*, des CT maintenus en culture *in vitro* avec un milieu contenant du sérum vont fusionner pour devenir des ST. Ils vont atteindre un degré maximal de différenciation au quatrième jour de culture et cela est visible par le changement de morphologie des cellules qui fusionnent pour former des syncytiums contenant plusieurs noyaux. La différenciation des trophoblastes est aussi observable grâce à l'augmentation de la sécrétion des hormones hCG et hPL. La sécrétion de ces deux hormones par les trophoblastes en culture augmente en fonction des jours de culture, atteignant un maximum au quatrième jour et diminuant par la suite (Daoud et al., 2005). C'est donc ces modifications morphologiques et biochimiques qui vont nous indiquer le degré de différenciation des ST humains. Toutefois, lorsque les CT sont maintenus dans des conditions dépourvues de sérum, leur capacité à fusionner est diminuée (Morrish et al., 1997) ou totalement disparue (Kao et al., 1988).

1.1.3 Conditions pathologiques lors de la grossesse

Au cours de la grossesse, il peut survenir différentes conditions pathologiques pouvant affecter la santé de la mère et du fœtus. La pré-éclampsie (PE) est caractérisée par plusieurs symptômes dont une vasoconstriction généralisée, c'est-à-dire de l'hypertension (140/90 mmHg), une augmentation de la réactivité vasculaire, de l'œdème excessif, l'activation des plaquettes et de la protéinurie ($>0,3$ g/j) (Forest et al., 1989). L'origine de cette condition pathologique semblerait être une combinaison de plusieurs facteurs tels que des facteurs génétiques, environnementaux, immunologiques et nutritionnels. On soupçonne cependant qu'une mauvaise placentation pourrait causer la PE. En effet, un défaut lors de l'invasion des CT extravillieux et un mauvais remodelage des artères spiralées sont souvent retrouvés dans les cas de PE (Zhou et al., 1993, Zhou et al., 1997, Redman and Sargent, 2000). Cela mène donc à une hypoperfusion de l'unité utéroplacentaire et à une hypoxie relative des tissus

trophoblastiques. Cette ischémie locale conduit alors à la production de radicaux libres et à l'apparition d'une réaction inflammatoire (Redman and Sargent, 2001). De plus, des marqueurs du stress oxydatif ont été retrouvés en forte concentration dans la décidue de placentas provenant de grossesses avec PE (Raijmakers et al., 2004) et certains de ces marqueurs peuvent inhiber l'invasion des CT extravilleux (Tjoa et al., 2004).

Des études cliniques ont aussi démontré une forte association entre la PE et une altération du métabolisme calcique maternel (Ritchie and King, 2000, Ohara, 2001). Cette modification du transport du calcium pourrait être dû à une production inadéquate du peptide apparenté à la parathormone (PTHrP) lors de cette condition pathologique (Halhali et al., 2001).

La PE est souvent associée à une autre condition pathologique lors de la grossesse (1 fois sur 3), le retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Eskenazi et al., 1993). Cette condition pathologique de grossesse affecte 6% des naissances en Amérique du Nord (Forest et al., 1989). En plus de ne pas atteindre sa taille optimale, l'enfant né des suites d'un RCIU a des risques accrus de développer à l'âge adulte des maladies cardiovasculaires et des problèmes métaboliques tels que l'obésité, des maladies rénales, de l'hypertension et du diabète (Barker et al., 1993). Cette condition pathologique est souvent liée à un apport nutritionnel inadéquat causé par une diminution de la masse syncytiale. De plus, des problèmes lors de l'angiogenèse et de la vasculogenèse du placenta sont aussi à l'origine du RCIU.

Une altération de la fusion des CT en ST pourrait contribuer au développement de ces conditions pathologiques en diminuant l'apport des nutriments essentiels à la croissance fœtale (Newhouse et al., 2007). En effet, les CT issus de grossesses avec RCIU montrent une augmentation de la fusion cellulaire et une augmentation de la sécrétion de hCG par rapport à des CT provenant de grossesses normales (Newhouse et al., 2007). Par conséquent, la différenciation en ST est différente pour des cellules provenant de grossesses avec RCIU, avec PE ou avec ces deux conditions pathologiques (Newhouse et al., 2007).

1.2 Le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP)

Pendant plus de 40 ans, médecins et chercheurs ont tenté de découvrir ce qui causait l'hypercalcémie humorale maligne (HHM). Ce n'est qu'en 1987 qu'on a pu affirmer que le responsable de ce syndrome paranéoplasique était la PTHrP. Cette dernière est donc augmentée dans les cas de HHM et dans 75% des cas de cancers du sein avec métastases aux os (Rankin et al., 1997). En effet, lorsqu'une tumeur relâche la PTHrP dans la circulation sanguine, cette hormone stimule de manière endocrine la résorption osseuse et la réabsorption rénale du calcium. Elle agit par le récepteur à la parathormone (PTH) de type 1 (PTH1R), un récepteur commun à la PTH et à la PTHrP. Le PTH1R peut lier ces deux hormones avec la même affinité puisque la PTH et la PTHrP possèdent une forte homologie de séquence dans leur région N-terminale. Malgré cela, peu après sa découverte, il était évident que la PTHrP était bien différente de la PTH.

1.2.1 Caractéristiques de la PTHrP

En dépit de leur similitude, la PTH et la PTHrP sont le produit de deux gènes distincts situés sur des chromosomes différents. Le gène de la PTHrP est situé sur le chromosome 12 et est plus complexe que celui de la PTH situé sur le chromosome 11. Chez l'humain, le gène de la PTHrP va donner lieu à la formation de jusqu'à 12 transcrits par l'épissage alternatif et de trois produits initiaux de la traduction de différentes longueurs (figure 1.3). Ces différents isoformes de la PTHrP vont ensuite être transformés par des membres de la famille des convertases de prohormone en trois fragments distincts. Ces fragments de la PTHrP, soient le fragment N-terminal (PTHrP 1-36), la famille des fragments du centre et la région C-terminale (PTHrP 107-139) ont des propriétés biologiques propres à chacun. Le fragment du centre peut être composé d'un nombre variable d'acides aminés et ainsi former la PTHrP 38-94, la PTHrP 38-95 ou la PTHrP 38-101 (Wu et al., 1996).

Chez les adultes en bonne santé, les concentrations sériques de la PTHrP ne sont pas détectables. Cette hormone est toutefois produite de manière autocrine et paracrine lors de la

vie fœtale et adulte par de nombreux tissus et types cellulaires tels les épithéliums, les tissus du mésenchyme, les glandes endocrines et le système nerveux central.

1.2.2 PTH1R

Le récepteur liant les fragments N-terminal de la PTH et de la PTHrP est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires. Cependant, les récepteurs ayant pour ligand les fragments centraux et C-terminal de la PTHrP n'ont pas encore été isolés. Le PTH1R est exprimé à de hauts niveaux dans les os et les reins où il est impliqué dans l'homéostasie du calcium. Il a été démontré que c'était la région 15-34 de la PTH et de la PTHrP qui se liait avec le domaine N-terminal du récepteur PTH1R. La région en amont de ces hormones est nécessaire pour obtenir une activité biologique via la voie AMP/PKA. Pour cela, les régions N-terminales de la PTH et de la PTHrP (1-36) doivent faire contact avec les boucles extracellulaires 5 et 6 du PTH1R (Juppner, 1999, Mannstadt et al., 1999).

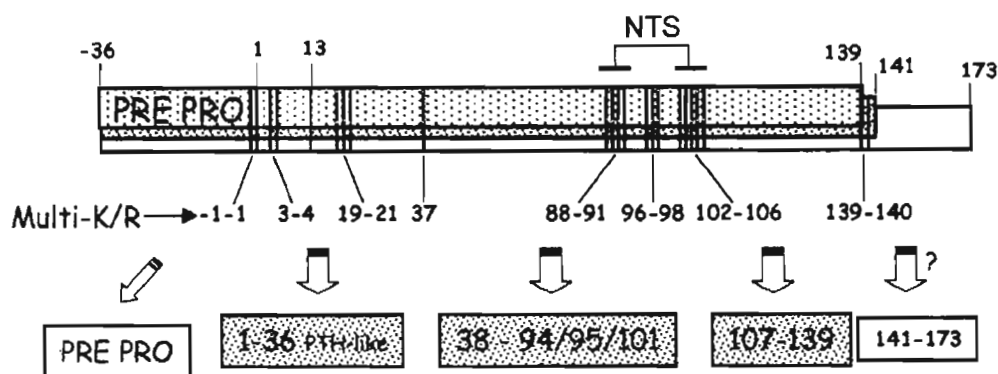


Figure 1.3 : Structure du gène de la PTHrP. Tiré de Clemens et al. *British Journal of Pharmacology*, (2001) 134, 1113-1136.

1.2.3 Rôles physiologiques de la PTHrP

La PTHrP est une hormone calciotropique similaire à la PTH, un myorelaxant, un facteur de croissance et un régulateur du développement. Chez l'homme, le gène de la PTHrP est exprimé dans une grande variété de tissus sains. Cette hormone va agir de manière autocrine et paracrine. Afin de déterminer les rôles physiologiques de cette hormone, Karaplis et al. (1994) ont créé une souris nulle pour ce gène. Ces souris mouraient peu de temps après la naissance des suites d'une sévère chondrodysplasie (Karaplis et al., 1994). Ces résultats soulignent donc l'implication probable de la PTHrP dans le développement du squelette. Pour sa part, le fragment C-terminal de la PTHrP permet d'inhiber la résorption osseuse (Fenton et al., 1991, Cornish et al., 1997) et de stimuler la croissance des ostéoblastes (Cornish et al., 1999). Le fragment N-terminal de la PTHrP est capable, quant à lui, de mimer les effets de la PTH sur les cellules osseuses tels la stimulation de l'adénylate cyclase (Kemp et al., 1987), l'activation du calcium intracellulaire comme second messenger et l'inhibition de la phosphatase alcaline et de la croissance cellulaire (Civitelli et al., 1989). De plus, *in vivo*, la PTHrP produit aussi la phosphaturie et la calciurie, en plus d'activer la synthèse de la 1,25-dihydroxyvitamine D (Horiuchi et al., 1987, Fraher et al., 1992). La PTHrP est exprimé à de hauts niveaux dans les épithéliums mammaires en lactation chez le rat (Thiede and Rodan, 1988) et, chez la femme, elle est sécrétée dans le lait à des concentrations 10 000 fois plus élevées que dans le sérum (Budayr et al., 1989). Chez le rat, la PTHrP est aussi sécrétée par les muscles lisses comme le myomètre (Thiede et al., 1990) et la vessie (Yamamoto et al., 1992) en réponse à un stress mécanique. Dans les glandes parathyroïdes fœtales du rat, la PTHrP peut remplacer la PTH afin de réguler la calcémie (Lewin et al., 2000).

1.2.4 La PTHrP et la grossesse

En plus d'être impliquée dans plusieurs processus biologiques à travers l'organisme, la PTHrP agit de différentes manières au cours de la grossesse humaine et plus particulièrement au niveau du placenta. Ainsi, il est suggéré que la PTHrP permettrait la vasodilatation et la relaxation des muscles lisses de l'utérus (Macgill et al., 1997, Curtis et al., 2000), la

régulation du transfert de calcium à travers le placenta (Kovacs and Kronenberg, 1997) ainsi que la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire (Lee et al., 1995b). Compte tenu de la diminution des niveaux de PTHrP dans l'amnion et le myomètre au début du travail chez l'humain, Ferguson et al. (1992) ont suggéré que le fragment N-terminal serait impliqué dans cette étape de l'accouchement. Bien que la PTHrP soit impliquée dans différents processus de croissance et de différenciation, ses effets sur les tissus gestationnels sont encore méconnus. Toutefois, comme elle est exprimée par l'amnion (Bowden et al., 1994), le chorion (Ferguson et al., 1992, Bowden et al., 1994), le cordon ombilical (Ferguson et al., 1994) et plus particulièrement les ST (Abbas et al., 1990, Emly et al., 1992), il y a de fortes probabilités qu'elle y joue un rôle important (Ferguson et al., 1992, Curtis et al., 2000). La PTHrP est largement distribuée à l'intérieur du liquide amniotique et elle agit sur la croissance et la différenciation des épithéliums, en plus d'avoir un effet paracrine sur le tonus vasculaire du placenta et le transfert de calcium (Farrugia et al., 2000a).

1.2.5 Implication de la PTHrP dans le transport du calcium à travers le placenta

On retrouve une concentration plus importante en ion calcique dans le sang fœtal en comparaison au niveau sanguin maternel. La PTH, tout comme la PTHrP, est impliquée dans le maintien de ce gradient, cette dernière ayant toutefois un rôle plus important (Kovacs and Kronenberg, 1997). Des études chez les brebis gestantes ont démontré qu'une parathyroïdectomie chez le fœtus élimine la présence de ce gradient électrochimique. Toutefois, l'infusion de PTHrP contenant la région 35-86 dans les artères ombilicales permettait de rétablir ce gradient de calcium (Care et al., 1990). Kovacs and Kronenberg (1997) ont aussi pu observer un tel phénomène chez la souris. En effet, chez des souris nulles pour le gène de la PTHrP, le transport du calcium à travers le placenta était déficient et les concentrations sériques de cet ion étaient basses. Encore une fois, l'injection du fragment central de la PTHrP permettait de stimuler le transport du calcium de la mère au fœtus et de restaurer le gradient de cet ion. De plus, la PTHrP (38-94) stimule le transport du calcium dépendant de l'ATP dans la membrane basale des ST humains (Strid et al., 2002). Ces

expériences ont pu démontrer le rôle crucial de la PTHrP, en particulier pour le fragment central, dans l'homéostasie du calcium fœtal et dans le transport transplacentaire de cet ion.

1.2.6 Implication de la PTHrP dans la différenciation des trophoblastes

La PTHrP est impliqué dans différents processus de différenciation dont celle des kératinocytes chez la souris adulte (Foley et al., 1998). La souris est d'ailleurs un modèle approprié pour étudier la formation du placenta humain compte tenu de leur mode de placentation similaire. Toutefois, chez les souris, ce sont les cellules géantes trophoblastiques (TGC) secondaires qui sont responsables des échanges mère-fœtus. Considérant son effet sur la différenciation des chondrocytes et sur la croissance des cellules géantes trophoblastiques primaires, El-Hashash et al. (2005) ont voulu étudier l'effet de la PTHrP sur la différenciation des TGC secondaires murins. Ainsi, ils ont pu découvrir qu'un traitement à la PTHrP (1-34) influait sur la différenciation des TGC en stimulant l'expression de facteurs de transcription permettant leur formation. De plus, la PTHrP (1-34) inhibait la formation des autres types trophoblastiques (El-Hashash et al., 2005). En conséquent, la PTHrP semble être un joueur important dans le processus de différenciation des TGC murins.

En plus de permettre la différenciation des trophoblastes murins, la PTHrP (1-34) serait un facteur de survie des trophoblastes, inhibant ainsi l'apoptose (Crocker et al., 2002). Cette hormone semble aussi jouer un rôle dans l'invasion des trophoblastes puisque la PTHrP (1-40) stimule le relâchement de métalloprotéinases (Uchida et al., 2001, Maioli et al., 2002).

1.2.7 La PTHrP et les conditions pathologiques lors de la grossesse

On soupçonne la PTHrP de jouer un rôle dans le développement de certaines conditions pathologiques lors de la grossesse. En effet, Halhali et al. (2001) ont montré une faible concentration de cette hormone dans le sang maternel et le cordon dans les cas de PE, alors que son expression est augmentée dans l'amnion et la choriodecidue des grossesses avec

RCIU (Curtis et al., 2000). Ainsi, cette hormone pourrait être impliquée dans le développement de ces conditions pathologiques via une défectuosité lors de l'invasion des trophoblastes puisque la PTHrP stimule l'expression et le relâchement de métalloprotéinases (MMP) dans plusieurs cellules (Uchida et al., 2001, Maioli et al., 2002). La PTHrP est aussi augmentée dans les membranes maternelles et fœtales (Curtis et al., 2000) et dans le plasma du cordon (Strid et al., 2003) dans les cas de RCIU. Ainsi, la PTHrP pourrait jouer un rôle dans l'apparition de ces conditions pathologiques.

1.3 Les protéines activées par des mitogènes (MAPK)

La découverte des MAPKs a permis de faire des avancées importantes dans notre compréhension du contrôle de la signalisation cellulaire. À ce jour, près de 20 MAP kinases sont connues chez les mammifères. En plus des très étudiées kinases ERK1 et ERK2 (Ray and Sturgill, 1987, Boulton et al., 1990, Boulton et al., 1991, Gotoh et al., 1991), il existe les isoformes de ERK3 (Boulton et al., 1991, Gonzalez et al., 1992, Zhu et al., 1994), ERK4 (Boulton and Cobb, 1991), ERK5 (Lee et al., 1995a, Zhou et al., 1995), les trois gènes des kinases N-terminal Jun/protéines kinases activées par le stress (JNK/SAPKs) et leurs variants (Derijard et al., 1994, Kyriakis et al., 1994), la famille de p38 (α , β , γ ou δ) (Han et al., 1994, Lee et al., 1994, Jiang et al., 1996, Lechner et al., 1996, Li et al., 1996, Jiang et al., 1997, Stein et al., 1997) et la MAP kinase p57 (Lee et al., 1993).

1.3.1 Caractéristiques des MAPKs

Les MAPKs font partie intégrante d'une cascade de signalisation impliquant trois enzymes activées en série : suite à un stimulus extra-cellulaire, une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) va activer une MAP kinase kinase (MAPKK) [ou MAP/ERK kinase (MEK)] qui va, à son tour, activer une MAP kinase (MAPK), ce qui donne naissance à une réponse biologique (figure 1.4). La MAPK est donc apte à transmettre le signal cellulaire lorsqu'elle se retrouve sous sa forme phosphorylée. Les MEKs agissent de manière très spécifique. En

effet, chaque MEK ne phosphoryle qu'une seule ou quelques MAP kinases. Cette cascade d'activation permet non seulement de convoyer l'information à un effecteur ciblé, mais aussi de coordonner les informations provenant d'autres voies de signalisation et d'amplifier le signal cellulaire (Khokhlatchev et al., 1998).

Dans la cascade d'amplification de ERK, on retrouve MEK1/2 en plus forte concentration que Raf, la MAPKKK qui va activer MEK1/2 (Ferrell, 1996, Huang and Ferrell, 1996). Cette étape permet donc d'amplifier le signal vers ERK. Cependant, on retrouve MEK1 et MEK2 dans des proportions similaires à celles de ERK1 et ERK2 (Ferrell, 1996). La deuxième étape d'activation n'est donc pas impliquée dans l'amplification du signal.

MEK1 et MEK2 vont phosphoryler deux sites sur ERK1/2; il y aura tout d'abord phosphorylation d'une tyrosine et, par la suite, d'une thréonine (Payne et al., 1991, Seger et al., 1991, Robbins and Cobb, 1992, Robbins et al., 1993). La phosphorylation des deux sites est nécessaire pour activer fortement ERK (Anderson et al., 1990, Robbins et al., 1993, Zhang et al., 1995, Khokhlatchev et al., 1997). Ainsi, puisqu'une double phosphorylation est nécessaire à l'activation de ERK, il y aura tout d'abord l'établissement d'un seuil d'activation (Ferrell, 1997, Ferrell, 1999). Les protéines phosphorylées sur un résidu tyrosine ne sont pas actives et s'accumulent. Lorsque cette accumulation atteint un certain seuil, il y a phosphorylation rapide du résidu thréonine.

Plusieurs interactions sont possibles entre les différentes cascades des MAP kinases. Par exemple, il y a un certain chevauchement dans les substrats pouvant activer les MAP kinases (Fukunaga and Hunter, 1997, Waskiewicz et al., 1997, Lewis et al., 1998).

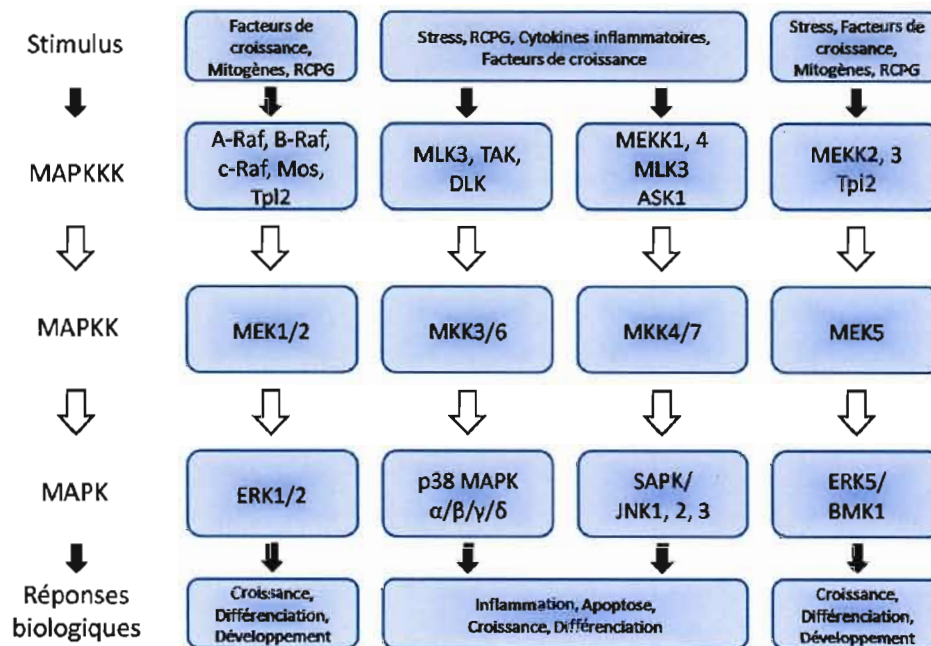


Figure 1.4 : Voies de signalisation des MAPKs et leurs réponses biologiques. Tirée de Pearson et al. *Endocrine Review*, (2001) 22, 153-183.

1.3.2 La famille des ERKs

ERK1 et ERK2 sont des protéines respectivement de 43 et 41 kDa. Ces deux MAP kinases possèdent 85% d'homologie ciblée particulièrement dans la région de liaison des substrats (Boulton et al., 1990, Boulton et al., 1991). Les résidus tyrosine et thréonine qui sont phosphorylés lors de l'activation de la MAP kinase sont séparés par un résidu glutamate. Ainsi, on retrouve le motif TEY (thréonine-glutamate-tyrosine) dans la boucle d'activation de ERK1 et ERK2 (Payne et al., 1991). ERK1 et ERK2 sont tous deux exprimés de manière ubiquitaire bien que leur abondance relative soit variable en fonction du tissu. Ces deux MAP kinases sont activées par de nombreux ligands et par des perturbations cellulaires avec toutefois une certaine spécificité cellulaire (Lewis et al., 1998). Par exemple, dans les fibroblastes, ERK1 et ERK2 sont activés par le sérum, des facteurs de croissance, des cytokines, certains stress, des ligands de RCPG et des agents transformants. Ces kinases sont aussi fortement exprimées dans les neurones post-mitotiques et d'autres cellules différenciées (Boulton et al., 1991).

1.3.2.1 Cascade d'activation de ERK1 et ERK2

La voie de signalisation qui relie la membrane cellulaire à ERK1 et ERK2 la mieux définie est sans aucun doute celle qui emprunte les récepteurs à tyrosine kinases. Lorsqu'un récepteur tyrosine kinase est lié à son ligand, il y a déclenchement de son activité tyrosine kinase intrinsèque, ce qui conduit à son auto-phosphorylation sur les résidus tyrosine (figure 1.5). Des molécules adaptatrices comme Grb2 et Shc vont venir se lier au récepteur (Pawson and Scott, 1997). Ces molécules contiennent un domaine SH2 de liaison à la tyrosine phosphorylée. Le domaine SH3 de la molécule adaptatrice va, quant à lui, lier une région riche en proline de Sos (Son of Sevenless) (Li et al., 1993, Pawson and Scott, 1997). La protéine Sos permet d'augmenter la relâche de GDP et la liaison de GTP à Ras, une protéine G monomérique. Le complexe formé de GTP et de Ras va lier Raf et cette liaison va induire un changement conformationnel de Raf qui induit une augmentation de son activité kinase. Par la suite, il y a translocation vers la membrane plasmique et la cascade des kinases est activée (Moodie et al., 1993, Vojtek et al., 1993, Warne et al., 1993, Zhang et al., 1993, Dent et al., 1995, Jelinek et al., 1996, Morrison and Cutler, 1997). À la membrane, Raf peut aussi être modulé par des protéines kinases tels Src, PKC et Akt qui augmentent son activité (Fabian et al., 1993, Kolch et al., 1993, Dent et al., 1995, Diaz et al., 1997, Chaudhary et al., 2000). Lorsqu'il est activé, Raf va phosphoryler et stimuler MEK1 ou MEK2 qui sont les activateurs de ERK1 et ERK2 (figure 1.5) (Ahn et al., 1991, Crews et al., 1992, Kosako et al., 1992, Nakielnny et al., 1992, Seger et al., 1992, Wu et al., 1993, Zheng and Guan, 1993). Ainsi, lorsqu'il est sous sa forme phosphorylée, ERK permet de transférer le signal perçu à la membrane en réponse cellulaire.

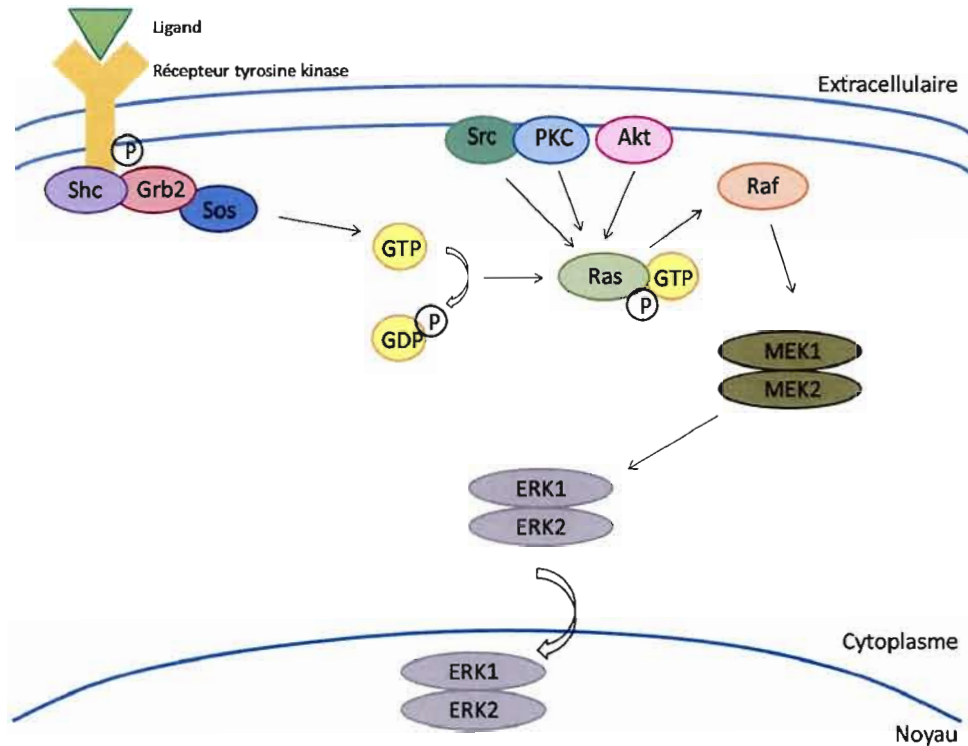


Figure 1.5 : Cascade d'activation de ERK1 et ERK2

1.3.3 La famille des p38s

p38 α fut le premier isoforme à être découvert. Par la suite, on utilisa le clonage moléculaire pour identifier les autres membres de la famille p38, soit p38 β (ou p38-2), p38 γ (ERK6 ou SAPK3) et p38 δ (SAPK4) (Jiang et al., 1996, Lechner et al., 1996, Li et al., 1996, Goedert et al., 1997, Jiang et al., 1997, Kumar et al., 1997, Stein et al., 1997). Ces quatre isoformes de p38 possèdent le motif TGY (thréonine-glycine-tyrosine) dans leur boucle d'activation, c'est-à-dire que les résidus thréonine et tyrosine sont séparés par un résidu glycine. Une grande variété d'agents peuvent activer les membres de la famille p38 tels les cytokines, les hormones, les RCPG, un choc osmotique ou de température et d'autres stress cellulaires (Wang et al., 1998, Wu et al., 2000). Les MAP kinases p38 sont activées par deux membres de la famille des MEKs, soit MEK3 et MEK6 (Derijard et al., 1995, Han et al., 1996, Stein et al., 1996, Enslen et al., 2000). MEK3 phosphoryle de manière préférentielle les isoformes

p38 α et p38 β , alors que MEK6 active les quatre membres de la famille p38 (Enslin et al., 2000).

1.3.4 Les MAPKs dans la différenciation des trophoblastes

Les MAPKs sont impliquées dans divers processus cellulaires dont la différenciation. En effet, les voies de ERK1/2 et de p38 ont une grande importance dans la différenciation de nombreux types cellulaires tels les adipocytes (Engelman et al., 1998, Engelman et al., 1999), les cardiomyocytes (Kolodziejczyk et al., 1999, McKinsey and Olson, 1999), les chondroblastes (Nakamura et al., 1999), les érythroblastes (Nagata et al., 1998), les myoblastes (Cuenda and Cohen, 1999, Galbiati et al., 1999, Zetser et al., 1999) et les neurones (Morooka and Nishida, 1998, Iwasaki et al., 1999). Mudgett et al. (2000) ont démontré que p38 α est essentiel au développement des trophoblastes diploïdes et de la vascularisation placentaire chez la souris. De plus, les MAPKs joueraient un rôle critique dans la croissance et la migration des trophoblastes (Gleeson et al., 2001, McKinnon et al., 2001).

Cependant, l'implication de ces voies lors de la différenciation des trophoblastes humains est très peu connue. Daoud et al. (2005) ont démontré que les MAPKs ERK1/2 et p38 étaient essentielles à l'initiation de la différenciation des trophoblastes humains. Plus précisément, la voie de p38 est davantage sollicitée que celle de ERK1/2 et l'inhibition d'une de ces voies retarde la différenciation des trophoblastes en culture. Il a aussi été démontré que l'inhibition d'une de ces kinases semble permettre une activation plus importante de l'autre. Cela suggère donc l'existence d'un mécanisme compensatoire qui tenterait de maintenir le processus de différenciation à un niveau adéquat (Daoud et al., 2005). Il reste encore à découvrir les kinases agissant en amont de ERK1/2 et de p38 et qui entrent en jeu dans la différenciation des trophoblastes humains.

1.4 Le transport du calcium dans le placenta

Au nombre des changements qui surviennent au cours de la grossesse, une adaptation de l'absorption intestinale du calcium doit se faire pour permettre une minéralisation adéquate du squelette et une croissance adéquate du fœtus. Au même moment, le placenta va permettre de transférer près de 30 g de calcium au fœtus, en grande partie lors du troisième trimestre de grossesse à un taux de 140 mg/kg/jour (Salle et al., 1987). Lorsqu'il se retrouve dans la circulation fœtale, en plus de servir à la minéralisation osseuse, le calcium va permettre la sécrétion hormonale, des fonctions enzymatiques, la signalisation cellulaire, la contraction musculaire et d'autres processus métaboliques.

Le transfert de calcium s'effectue à travers les ST, une barrière sélective pour de nombreux nutriments. Ce type cellulaire permet, en effet, le transport de près de 80% du calcium nécessaire à la croissance du squelette fœtal (Barlet and Ravault, 1984, Bell, 1985). La cellule syncytiotrophoblastique est formée de deux membranes distinctes : la membrane en bordure en brosse (BBM) fait face à la circulation maternelle, alors que la membrane basale plasmique (BPM) se retrouve du côté de la circulation fœtale. Grâce à ses nombreuses microvillosités, la BBM possède une très grande surface d'échange, ce qui facilite l'absorption des nutriments. Comme la concentration calcique intracellulaire est faible par rapport à celle retrouvée dans le sang maternel (0,1-1 μM par rapport à 2,13 mM), le calcium libre peut traverser la BBM par des mécanismes passifs (Husain and Mughal, 1992, Kamath et al., 1992). Cependant, on peut aussi y retrouver des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Lafond et al., 2001). À l'intérieur des ST, le calcium va être transporté vers la membrane basale par des protéines liant le calcium (CaBP). Ce système de «navette» permet de tamponner la concentration intracellulaire de calcium et, ainsi, de ne pas altérer les processus cellulaires. Pour se retrouver dans la circulation fœtale, le calcium doit utiliser des mécanismes nécessitant de l'énergie (Lafond et al., 1991) pour traverser la BPM puisque la concentration calcique fœtale est plus élevée que celle retrouvée dans les ST. En effet, la concentration en calcium ionisé (Ca^{2+}) est plus importante chez le fœtus que celle retrouvée chez l'adulte (Delivoria-Papadopoulos et al., 1967). De plus, différentes hormones calcémiantes pourraient aussi être impliquées pour aider le calcium à contrer ce gradient comme la calcitonine,

l'hormone parathyroïdienne (PTH) et le peptide apparenté à la parathormone (PTHrP). Toutefois, près des deux tiers du calcium utilise la voie paracellulaire pour se rendre à la circulation fœtale (Stulc et al., 1994).

1.4.1 Les canaux transitoires à potentiel vanilloïdes (TRPV5 et 6)

Le transport transcellulaire de calcium se fait partiellement par la superfamille des canaux transitoires à potentiel (TRP) qui comprend trois sous-familles : TRPC, TRPM et TRPV (vanilloïdes) (figure 1.6) (Clapham et al., 2001). La sous-famille TRPV regroupe TRPV5 et TRPV6 qui sont des canaux hautement sélectifs au calcium (Clapham et al., 2001, Peng et al., 2001, Moreau et al., 2002a, Moreau et al., 2002b). Les résultats de recherches sur ces canaux laissent croire qu'ils sont impliqués dans la réabsorption du calcium par les reins et les intestins (Hoenderop et al., 2000, Hoenderop et al., 2002b). Ces canaux comportent six domaines transmembranaires avec de longs domaines intracellulaires en N- et C-terminal (Hoenderop et al., 2002b). Ils sont structurés en tétramères dans la membrane pour former un pore (Hoenderop et al., 2003). Les gènes codant pour ces deux canaux sont juxtaposés sur le chromosome 7q35 (Muller et al., 2000b). L'absence d'un seul résidu aspartate pour TRPV5 lui confère une sélectivité au calcium 20 fois moindre que celle de TRPV6 (Clapham et al., 2001, Peng et al., 2001). Certaines propriétés permettent de distinguer les canaux TRPV5 et 6 des autres canaux TRP : ils sont sensibles à la quantité de calcium intracellulaire et sont dépendants du voltage (Peng et al., 1999, Peng et al., 2001, Voets et al., 2001). L'activité de ces canaux est régulée par la PKC, la calmoduline (CaM) (Niemeyer et al., 2001) et le calcium (Van Cromphaut et al., 2001, Hoenderop et al., 2002a), alors que leurs niveaux d'expression transcriptionnels et traductionnels sont modulés par la 1,25-(OH)₂D₃ (Hoenderop et al., 2001a, Van Cromphaut et al., 2001, Wood et al., 2001, Fleet et al., 2002, Hoenderop et al., 2002a, Van Abel et al., 2002), l'œstrogène (Van Abel et al., 2002) et la PTH (van Abel et al., 2005). La CaM, quant à elle, ne semble agir que sur TRPV6 (Lambers et al., 2004).

1.4.1.1 TRPV5

En plus d'être exprimé dans le placenta, on retrouve TRPV5 dans le pancréas, les testicules, la prostate, le côlon et les reins (Hoenderop et al., 2001b). TRPV5 partage près de 75% d'homologie avec TRPV6. Son rôle principal serait la réabsorption du calcium dans les reins (Peng et al., 1999). Ce rôle dans l'absorption du calcium semble être confirmé par sa colocalisation dans le rein avec d'autres protéines impliquées dans le transport de cet ion, tels CaBP28k, NCX1 et PMCA1b (Hoenderop et al., 2000). L'ARNm de TRPV5 est exprimé dans le tissu placentaire (Muller et al., 2000a) de manière toutefois moins importante que TRPV6 (Peng et al., 2001). Dans les trophoblastes en culture, l'expression de TRPV5 augmente avec les jours de culture, tout comme l'absorption du calcium (Moreau et al., 2002b).

1.4.1.2 TRPV6

Le gène de TRPV6 est exprimé dans différents organes chez l'homme tels que l'intestin, le pancréas, le placenta, la prostate, les glandes salivaires et, de manière moins importante, dans les reins, le foie et les testicules (Peng et al., 2000, Peng et al., 2001). Le transport de calcium par ce canal est électrogénique, dépendant du voltage et sensible au pH. De plus, le transport de calcium n'est pas couplé à d'autres ions (Peng et al., 1999). Moreau et al (2002b) ont démontré que l'expression génique de TRPV6 dans les trophoblastes était dépendante du temps. En effet, l'expression de l'ARNm de TRPV6 était plus importante au deuxième et troisième jour de culture, alors que l'absorption du calcium y est plus importante.

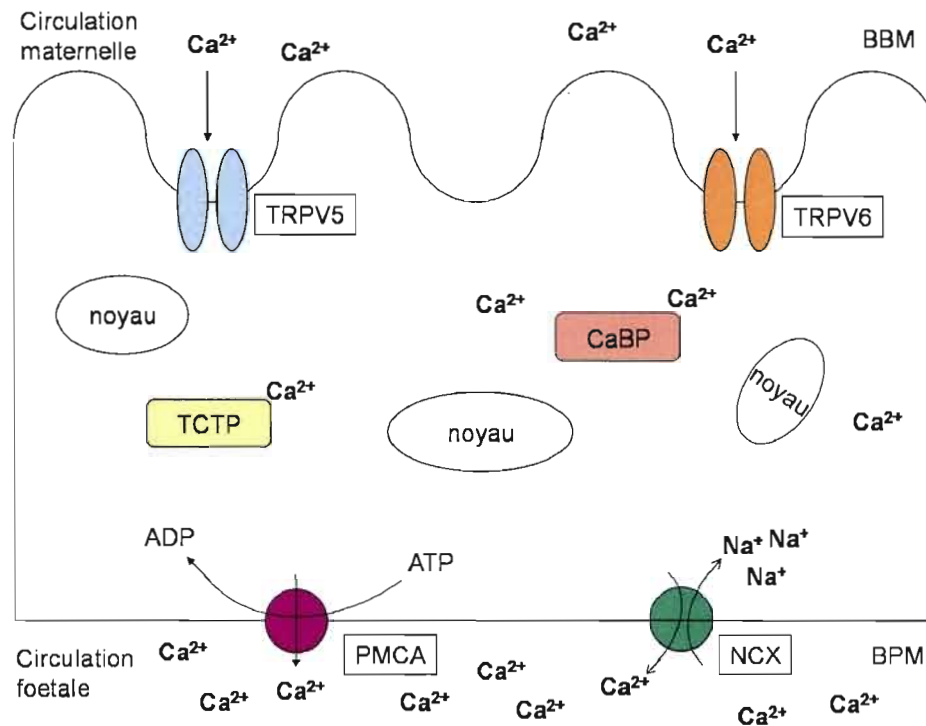


Figure 1.6 : Schématisation du transport de calcium à travers le syncytiotrophoblaste

Ca^{2+} : calcium; TRPV5 : canal transitoire à potentiel vanilloïde 5; TRPV6 : canal transitoire à potentiel vanilloïde 6; TCTP : protéine tumorale contrôlée par la traduction; CaBP : protéine liant le calcium; ADP : adénosine diphosphate; ATP : adénosine triphosphate; PMCA : pompe à calcium de la membrane plasmique; Na^+ : sodium; NCX : échangeur sodium/calcium; BBM : membrane en bordure en brosse; BPM : membrane basale plasmique. Adaptée de Lafond et al. *Endocrine*, (2001) 14, 285-294.

1.4.2 Les protéines liant le calcium (CaBPs)

Les CaBPs sont des protéines eucaryotes liant le calcium avec un motif spécifique de hélice-boucle-hélice (motif «EF-hand») (Berggard et al., 2000). Ces protéines sont dites sensibles au calcium puisqu'elles subissent un changement conformationnel suite à la liaison de cet ion (Gross and Kumar, 1990). La présence de ces protéines est essentielle au bon fonctionnement de la cellule puisque de grands changements dans les concentrations cytosoliques de calcium perturberaient les processus cellulaires (Tuan, 1985). On retrouve les protéines liant le calcium dans divers tissus tels le cerveau, les reins, les os, l'intestin, l'utérus et le placenta. Deux rôles ont été proposés pour les CaBPs : (i) de tamponner et transporter le calcium intracellulaire de la BBM à la BPM et (ii) de réguler directement ou indirectement l'activité

Ca²⁺-ATPasique. De plus, chez les mammifères, on retrouve la co-expression des canaux TRPV5 et 6 et des CaBPs au niveau de l'intestin, du pancréas et du placenta (Muller et al., 2000a, Hoenderop et al., 2001b). Les protéines de liaison du calcium vont tamponner la concentration calcique intracellulaire près des pores des canaux. Sans cela, les ions calciques libres effectueraient un rétro-contrôle négatif sur TRPV5 et 6 qui inhiberait leur activité. Bien que le mécanisme d'action des CaBPs ne soit pas encore élucidé, plusieurs hormones telles la vitamine D, l'œstrogène et la PTHrP semblent affecter leur action sur le transport calcique. En voici quelques-unes qui sont impliquées dans le transport de l'ion à travers le ST.

1.4.2.1 Calbindin-D9k (CaBP9k)

La CaBP9k est surtout exprimée dans le duodénum, l'utérus (Delorme et al., 1983) et le placenta (MacManus et al., 1986) de plusieurs mammifères. Toutefois, elle est distribuée de manière inégale dans les tissus fœtaux humains (Brun et al., 1987). Le rôle exact de cette protéine est encore méconnu, mais plusieurs études tendent à démontrer son implication dans le transport transcellulaire du calcium à travers le placenta (Christakos et al., 1989). Ainsi, Belkacemi et al. (2004) ont démontré que l'expression de CaBP9k était plus importante dans les ST que dans les CT. Puisque cette augmentation de l'expression de CaBP est observable lorsqu'il y a augmentation du niveau de calcium placentaire, cela suggère donc un rôle de «tampon» pour cette protéine dans le transport materno-fœtal du calcium (Belkacemi et al., 2004). De plus, dans les souris nulles pour le gène de la PTHrP, le transfert du calcium au placenta et l'expression de CaBP9k sont diminués, suggérant un rôle de cette hormone dans la régulation de l'expression de cette protéine (Kovacs et al., 2002).

1.4.2.2 Calbindin-D28k (CaBP28k)

Cette protéine de liaison du calcium a, quant à elle, été retrouvée dans une variété d'espèces et dans différents organes tels les os et les reins, mais aussi dans certains tissus ne régulant pas la concentration sérique du calcium comme le cerveau, le pancréas et le placenta

(Christakos et al., 1989). La large distribution de CaBP28k à travers les espèces et les tissus suggère que cette protéine jouerait un rôle métabolique fondamental (Thomasset et al., 1982). Bien qu'il n'y ait pas d'affiliation directe entre leur gène ou de similarité entre leur séquence protéique (Thomasset et al., 1982, Perret et al., 1988, Lomri et al., 1989), on suppose que CaBP9k et CaBP28k pourrait avoir des fonctions similaires au niveau du placenta humain (Belkacemi et al., 2003). Tout comme pour CaBP9k, CaBP28k est davantage exprimée dans les ST que les CT (Belkacemi et al., 2003). Cette élévation de l'expression de CaBP28k suite à la différenciation cellulaire se fait en parallèle avec l'augmentation de l'absorption du calcium (Belkacemi et al., 2003). Cette augmentation du niveau d'expression de CaBP28k pourrait d'ailleurs augmenter la capacité de tamponner le niveau de calcium intracellulaire ou stimuler un mécanisme d'entrée du calcium (Belkacemi et al., 2003). De plus, Lambers et al. (2006) ont démontré que CaBP28k est co-exprimée avec TRPV5 dans des cellules rénales, ce qui lui permet de tamponner le niveau de calcium près de l'entrée du canal lorsque le niveau de calcium intracellulaire est bas et, ainsi, d'empêcher l'inactivation de TRPV5.

1.4.2.3 La protéine tumorale contrôlée par la traduction (TCTP)

TCTP est une protéine hautement conservée et abondamment exprimée dans les règnes animal et végétal (Bommer and Thiele, 2004). Plusieurs fonctions lui ont été associées telles la prévention de l'apoptose (Li et al., 2001), la croissance cellulaire (Thomas and Thomas, 1986, Bohm et al., 1989) et la relâche de l'histamine par les basophiles (MacDonald et al., 1995). Plusieurs groupes de recherche ont également démontré sa propriété à lier le calcium (Sanchez et al., 1997, Xu et al., 1999, Gnanasekar et al., 2002, Arcuri et al., 2004). Toutefois, TCTP ne possède pas d'homologie de séquence avec les autres protéines pouvant lier le calcium (Kim et al., 2000). Nous savons maintenant qu'elle est similaire à une famille de petites protéines chaperonnes qui inclut Mss4 et Dss4 (Thaw et al., 2001). Arcuri et al. (2005) ont établi que TCTP était exprimé dans le placenta humain. Plus spécifiquement, cette protéine est davantage exprimée dans les placentas à terme que ceux de premiers trimestres. L'implication de TCTP dans le transport transplacentaire de calcium est suggérée dans cette étude puisque l'atténuation de ce gène altère l'absorption du calcium (Arcuri et al., 2005).

1.4.3 Les pompes à calcium de la membrane plasmique (PMCA)

Les CaBPs ne sont pas les seules protéines à contrôler la concentration intracellulaire de calcium. Ainsi, en plus d'aider à maintenir une faible concentration cytoplasmique en ion calcique, les PMCAs permettent aussi son expulsion de la cellule (Zylinska et al., 2002, Zoccola et al., 2004). Pour cela, la pompe PMCA va passer par deux états conformationnels différents lorsqu'elle est phosphorylée, soit les états E1 et E2. Lorsqu'elle se trouve en état E1, la pompe expose un site de liaison au calcium de haute affinité du côté intracellulaire de la membrane plasmique ce qui causerait la liaison de l'ion calcique. La phosphorylation d'un résidu aspartate par l'ATP permettrait un changement conformationnel et une transition vers l'état E2-phosphorylé. Lorsqu'elle se retrouve en état E2, la pompe PMCA expose le calcium lié du côté extracellulaire de la membrane plasmique et diminue l'affinité de son site de liaison, permettant la relâche du calcium dans le milieu extracellulaire. Suite à la relâche du calcium, l'intermédiaire E2-phosphorylé est clivé et la pompe retourne à l'état E1 (Krebs et al., 1987). Comme représenté à la figure 1.7, pour chaque molécule d'ATP hydrolysée, ces pompes vont transporter un ion calcique. Les PMCAs sont codées par quatre gènes (PMCA1 à 4) et, dû à l'épissage alternatif, il existe plus de 20 variants de cette protéine. Ces protéines sont constituées d'une longue chaîne polypeptidique organisée en dix domaines transmembranaires et quatre domaines cytosoliques. Les principales différences retrouvées entre ces isoformes se situent surtout au niveau de leur région régulatrice, en particulier dans la première boucle cytosolique située entre les deuxième et troisième domaines transmembranaires (figure 1.7) (Zylinska et al., 2002).

Les isoformes PMCA1 et 4 sont retrouvées dans presque tous les tissus, alors que PMCA2 et 3 se situent dans des tissus spécialisés (Zylinska et al., 2002). Chez l'humain, on retrouve PMCA1 en plus grande quantité que PMCA4 (Stauffer et al., 1995), alors que les niveaux d'expression de PMCA2 et 3 sont plus importants dans les muscles squelettiques fœtaux et le cerveau (Stauffer et al., 1993). PMCA2 est aussi exprimé dans les glandes mammaires et son activité est nécessaire pour avoir une forte concentration de calcium dans le lait (Reinhardt et al., 2000). Au niveau du placenta, les PMCAs joueraient un rôle important dans l'expulsion du calcium cytoplasmique des cellules placentaires. D'ailleurs, la présence des différents

isoformes de PMCA dans les ST humains, plus précisément sur la BPM, a été démontré (Moreau et al., 2003). Toutefois, bien qu'il n'y ait pas de changement dans l'expression des PMCA au cours du dernier trimestre de la grossesse, l'augmentation de la captation du calcium en présence d'ATP montre bien que l'activité du transporteur est augmentée (Strid and Powell, 2000).

Plusieurs molécules vont agir sur les PMCA afin de moduler leur activité. La liaison de la CaM, l'activateur traditionnel de ces protéines, va permettre de lever l'auto-inhibition de la pompe et d'augmenter son affinité pour le calcium (Gopinath and Vincenzi, 1977, Jarrett and Penniston, 1977). La CaM va se lier à son site de liaison (CaM-BD) (figure 1.7) et cette liaison va permettre de diminuer la constante de dissociation (K_d) de la pompe de 10-20 μM à une valeur inférieure à 1 μM (Enyedi et al., 1987, James et al., 1988). D'autres molécules, telles les protéines kinases A (PKA) et C (PKC) et des phospholipides acides (Kosk-Kosicka and Zylinska, 1997) peuvent aussi agir sur les PMCA afin d'augmenter leur affinité pour le calcium. Ainsi, l'augmentation de l'activité de ces pompes permettrait un apport adéquat en calcium pour la minéralisation osseuse du fœtus en croissance (Moreau et al., 2003). L'activité des PMCA est grandement modulée par la PTHrP (38-94). En effet, cette hormone stimulerait les PMCA en activant la voie IP-diacylglycérol-protéine kinase C (DAG-PKC) (Strid et al., 2002).

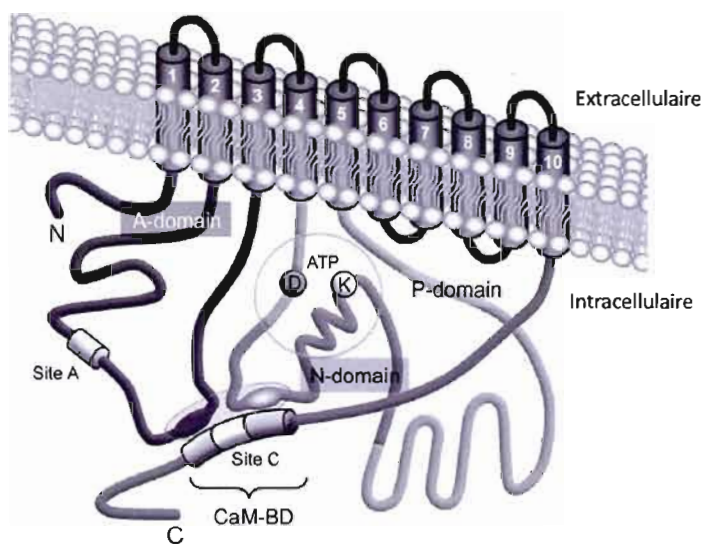


Figure 1.7 : Structure des pompes à calcium de la membrane plasmique (PMCA). Tiré de Di Leva et al. *Arch Biochem Biophys*, (2008) 476, 65-74.

1.4.4 Les échangeurs sodium/calcium (NCX)

Pour maintenir une concentration adéquate en calcium, plusieurs cellules de mammifères possèdent, en plus des PMCA, des échangeurs sodium/calcium (NCXs) situés à leur membrane plasmique (figure 1.6) (Kamath and Smith, 1994, Moreau et al., 2003). Les NCXs sont des échangeurs situés dans la membrane plasmique de plusieurs cellules qui permettent l'échange de trois ions sodium (Na^+) contre un ion calcium (Ca^{2+}) (Linck et al., 1998, Blaustein and Lederer, 1999). Chez les mammifères, il existe trois isoformes de cette protéine, soit NCX1 (Nicoll et al., 1990, Shieh et al., 1992, Li et al., 1994), NCX2 (Li et al., 1994) et NCX3 (Nicoll et al., 1996). Ces trois isoformes possèdent 11 segments transmembranaires avec une grande boucle intracellulaire entre les premier et sixième segments (Linck et al., 1998). NCX1 est surtout exprimé dans le muscle cardiaque où il joue un rôle dominant dans l'expulsion du calcium (Nicoll et al., 1990). Les isoformes NCX2 et 3 sont surtout retrouvés dans le cerveau et les muscles squelettiques (Li et al., 1994, Nicoll et al., 1996) et on a pu démontrer la présence des NCXs sur la BPM des ST (Kamath and Smith, 1994). La PTHrP active aussi NCX1 dans les ostéoblastes via l'AMPc (Azarani et al., 1995).

1.5 Hypothèses de travail

Bien que la PTHrP soit exprimée dans plusieurs tissus gestationnels, certaines questions ne sont pas encore résolues quant à son implication dans la formation du placenta. Toutefois, il est maintenant connu que le fragment N-terminal de la PTHrP est apte à stimuler la différenciation des TGC secondaires chez la souris. Chez l'humain, les MAPKs ERK1/2 et p38 sont impliquées dans l'initiation du processus de différenciation des cellules trophoblastiques. Au niveau placentaire, il a aussi été démontré que la PTHrP était impliquée dans le transport du calcium, plus précisément dans le maintien du gradient électrochimique de cet ion.

Ainsi, nous croyons que la PTHrP (1-34) permet la différenciation des cellules trophoblastiques humaines via l'activation des MAPKs ERK1/2 et p38. Nous pensons donc pouvoir observer une augmentation de la différenciation cellulaire ainsi qu'une augmentation de l'activation d'au moins une de ces MAPKs en présence du fragment N-terminal de la PTHrP. De plus, nous pensons que cette hormone stimule le transport de calcium à travers le placenta chez l'humain en augmentant l'expression des protéines impliquées dans le transfert de l'ion calcique de la mère au fœtus. Les échangeurs NCXs n'ont toutefois qu'un rôle mineur dans l'expulsion du calcium à travers le placenta (Williams et al., 1991), les PMCA y participant de manière plus active. C'est pourquoi nous ne nous sommes pas attardés à l'étude des NCXs lors de ce travail.

Afin de réaliser cette étude, nous devons tout d'abord mettre au point un milieu de culture sans sérum pour étudier l'effet direct du fragment N-terminal de la PTHrP sur la différenciation et le transport de calcium des cellules trophoblastiques humaines. Par la suite, nous allons isoler des cellules trophoblastiques à partir de placentas humains. Ces cellules seront mises en contact avec la PTHrP (1-34) pour une période de quatre jours, période nécessaire pour permettre une différenciation cellulaire. Cette différenciation cellulaire ou syncytialisation sera donc observée morphologiquement et biochimiquement. De plus, le niveau d'activation des MAPKs ERK1/2 et p38 sera mesuré par immunobuvardage de type Western. Dans un deuxième temps, afin d'étudier le transport de l'ion calcique dans le

modèle choisi, nous observerons la captation de calcium radiomarqué par des cellules trophoblastiques traitées avec la PTHrP (1-34). Enfin, l'expression génique et protéique de différentes protéines impliquées dans le transport du calcium sera analysée par PCR en temps réel et par immunobuvardage de type Western.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

2.1 Extraction des trophoblastes humains

Les placentas utilisés proviennent d'accouchements par voie vaginale. Il s'agit de grossesses menées à terme, soit entre 39 et 41 semaines de gestation. Les placentas ont été obtenus en accord avec le comité d'éthique de l'hôpital St-Luc du Centre Hospitalier Universitaire de Montréal (CHUM) (Montréal, Québec, Canada) et celui de l'Université du Québec à Montréal (UQÀM) (Montréal, Québec, Canada). L'isolation des trophoblastes se fait selon le protocole établi par Kliman et al. (1986) avec quelques modifications (Daoud et al., 2005). Après avoir retiré les membranes maternelles et fœtales du placenta, ce dernier est lavé pour enlever l'excédent de sang. Il subit par la suite une série de quatre digestions enzymatiques dans un milieu contenant du HBSS (Sigma-Aldrich) additionné de trypsine (Sigma) (1 824 000 U pour la première digestion, 1 200 000 U pour la deuxième et 960 000 U pour les troisième et quatrième digestions) et de désoxyribonucléase (DNase) (Roche Diagnostics) (0,25 mg/mL pour la première digestion, 0,15 mg/mL pour la deuxième et 0,12 mg/mL pour les troisième et quatrième digestions) pour 30 minutes sous agitation. Les cellules extraites sont ensuite déposées sur un gradient continu de Percoll (Sigma) allant de 5 à 70% et centrifugées à 1600 rpm pendant 25 minutes. Les bandes de densités 1,046 à 1,065 qui contiennent les trophoblastes sont récoltées. Les cellules sontensemencées à une densité de $1,5 \times 10^6$ cellules par puits pour une plaque de 24 puits à moins d'indication contraire. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO₂ et le milieu de culture est changé quotidiennement pour une période de quatre jours. La pureté de l'extraction des trophoblastes est évaluée par cytométrie en flux en utilisant un anticorps monoclonal conjugué avec FITC contre la protéine cytokératine-7 (1,25 µg/million de cellules, Cedarlane), un marqueur spécifique des trophoblastes. Les préparations contenant entre 80 et 97 % de trophoblastes ont été utilisées.

2.2 Mise au point du milieu de culture

Afin de trouver un milieu de culture de remplacement ne contenant pas de sérum de veau fœtal (FBS) ou en contenant en très faible quantité, différentes conditions sont étudiées. Le milieu de culture contrôle est constitué de DMEM (Gibco), de glutamine (Sigma) (2mM) et de pénicilline, streptomycine et néomycine (PSN) (Gibco) (1X) et additionné de FBS (Gibco) (10%). Dans le milieu de culture de remplacement, le FBS est remplacé par le supplément SITE-3 (Sigma) (1X) (tableau 2.1). Ainsi, parmi les différentes conditions étudiées on retrouve un milieu de culture contenant 1% de SITE-3, un milieu contenant 10% de SITE-3 et un milieu contenant 10% de FBS pour le premier jour de culture et remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3 pour les trois jours suivants. Une autre condition étudiée fut de concevoir un milieu contenant 0,5% de FBS pour le premier jour de culture et remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3 pour les trois autres jours. Un milieu contenant 1% de SITE-3 et 0,5% de FBS fut une dernière condition étudiée. La différenciation cellulaire fut observée par le dosage de la hCG et par immunofluorescence.

Tableau 2.1 : Concentration finale des éléments retrouvés dans le SITE-3 (Sigma)

Éléments	Concentration
Insuline	10 mg/L
Transferrine	5,5 mg/L
Sélénium	5 µg/L
Éthanolamine	2 mg/L
BSA	0,5 mg/mL
Acide linoléique	4,7 µg/mL
Acide oléique	4,7 µg/mL

2.2.1 Sécrétion de hCG par les trophoblastes

Quotidiennement, le milieu de culture des cellules trophoblastiques a été récolté, centrifugé et conservé à -20°C jusqu'au moment de l'analyse. La sécrétion de l'hormone hCG dans le milieu de culture a été analysée par technique ELISA selon les instructions du manufacturier (DRG Diagnostics). Les données provenant des analyses pour trouver un milieu de culture

sans sérum sont exprimées en mIU/mL, alors que celles provenant des analyses pour déterminer l'effet de la PTHrP sont exprimées selon la quantité de protéines présentes.

2.2.2 Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet d'observer s'il y a eu fusion cellulaire des ST suite aux différents traitements. Les cellules trophoblastiques humaines sont tout d'abord fixées avec du méthanol froid à -20°C pour 30 minutes, lavées, puis incubées avec du PBS contenant 2% de FBS pour une heure afin d'éliminer les liaisons non spécifiques. Les trophoblastes sont ensuite incubés pendant deux heures avec un anticorps monoclonal de souris anti-desmoplakine humaine (1/500) dans du PBS contenant 2% de FBS. Par la suite, il y a incubation pour une heure 30 minutes dans le noir avec un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Invitrogen) de chèvre dirigé contre les IgG de souris (1/1000) dans du PBS contenant 2% de FBS. Pour marquer les noyaux des cellules, les trophoblastes sont incubés pour 30 minutes dans le noir avec de l'iodure de propidium ($50\text{ }\mu\text{g/mL}$). Les cellules marquées sont par la suite visualisées avec un microscope confocal (BioRad MRC 1024) avec laser. Les observations ont été faites à 400X. Un syncytium est défini comme étant une cellule comprenant un minimum de trois noyaux (Daoud et al., 2005).

2.3 Effet de la PTHrP (fragment 1-34) sur la différenciation cellulaire

Pour tester l'effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation des trophoblastes, les cellules ont tout d'abord été mises en culture avec un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal. Après 24 h de culture, ce milieu est retiré, les cellules sont lavées avec du PBS afin d'enlever toute trace de sérum et remplacé par un milieu sans sérum (SITE-3). Ce milieu est changé quotidiennement pour les trois autres jours de culture *in vitro*. Différentes concentrations de PTHrP (1-34) ont été ajoutées, soit 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M durant les quatre jours de culture cellulaire. Des cellules trophoblastiques en contact avec un milieu contenant 10% de FBS pour les quatre jours de culture serviront de contrôle quant au développement cellulaire

adéquat, alors que les cellules cultivées avec SITE-3 serviront de contrôle quant à l'effet de l'hormone indépendamment des facteurs de stimulation de la différenciation présent dans le sérum ajouté au milieu de culture. La différenciation cellulaire est observée par le dosage de la hCG et par immunofluorescence (voir 2.2.1 et 2.2.2).

2.3.1 Essai de cytotoxicité

Les cellules trophoblastiques sont tout d'abordensemencées à une densité de $2,5 \times 10^5$ cellules par puits dans des plaques de 96 puits. Après 12 heures d'incubation avec le milieu de culture additionné ou non des différentes concentrations de PTHrP (1-34), le milieu de culture est remplacé par un milieu ne contenant pas de rouge de phénol additionné ou non des différentes concentrations de PTHrP (1-34). Grâce au CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega), il a été possible de mesurer la quantité de lactate déhydrogénase (LDH), une enzyme cytosolique stable, libérée dans le milieu de culture lors de la lyse cellulaire. La quantité de LDH retrouvée dans le milieu est mesurée grâce à la conversion des sels de tétrazolium retrouvé dans le substrat en un produit rouge. L'absorbance mesurée est ainsi proportionnelle au nombre de cellules lysées (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad). Le pourcentage de cellules viables a été établi par le rapport de l'absorbance à 490 nm des cellules traitées avec le supplément SITE-3 par rapport aux cellules non traitées.

2.3.2 Extraction de protéines

Quotidiennement, les protéines totales sont extraites des trophoblastes. Après avoir retiré le milieu de culture, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, puis solubilisées dans un tampon de radioimmunoprécipitation (RIPA) (150 mM de NaCl, 10mM de Tris, 1 mM de EGTA et de EDTA, 1% de Triton X-100, 100 mM de sodium fluoride, 10 mM de sodium pyrophosphate et 2 mM de sodium orthovanadate) (produits provenant de Sigma) et collectées. Les cellules reposent pour 30 minutes dans de la glace et sont mélangées à toutes

les 5 minutes. Elles subissent par la suite une centrifugation à 13 000 g pour 30 minutes à 4°C afin de séparer les débris des protéines cellulaires. La concentration protéique est ensuite mesurée par spectrophotométrie (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad) en utilisant les solutions BCA (Pierce).

2.3.3 Analyse par immunobuvardage (Western Blot)

Les protéines cellulaires (15,0 µg) sont dissoutes dans un tampon d'échantillonnage (4% de SDS, 30mM de dithiotreitol, 0,25 M de sucrose, 0,01 M de EDTA- Na_2 et 0,075% de bleu de bromophénol) et chauffées à 95°C pour 5 minutes dans un bloc chauffant afin de les dénaturer. Elles sont ensuite séparées par un gel SDS-PAGE de 12% et transférées sur une membrane de PVDF durant 30 minutes avec l'appareil transblot de BioRad. Les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués par du TBS-T [20 mM Tris (pH 7,6), 137 mM NaCl et 0,05% Tween-20] contenant 5% de lait écrémé pour une heure à température ambiante. Le premier anticorps est incubé avec la membrane au cours de la nuit à 4°C sous agitation (1/2000 pour anti-phospho-ERK1/2 et ERK1/2, 1/500 pour anti-phospho-p38, 1/1000 pour anti-p38). Les membranes sont lavées trois fois avec du TBS-T puis mis en contact avec le deuxième anticorps IgG anti-lapin conjugué à la peroxydase « horseradish » (1/1500) pour 2 heures à température ambiante. Les membranes sont rincées, puis détectées avec une solution de chemiluminescence (Roche Diagnostics) et visualisées par autoradiographie. Les anticorps primaires et secondaires sont enlevés au cours d'une incubation de 10 minutes avec une solution contenant de la glycine et du SDS, les membranes sont lavées deux fois, puis les sites non spécifiques sont bloqués à nouveau avec du TBS-T contenant 5% de lait écrémé pour une heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite mises en contact avec un nouvel anticorps, soit anti-ERK1/2 après phospho-ERK1/2 et anti-p38 après phospho-p38. La densitométrie est ensuite calculée à l'aide du logiciel Quantity One de Bio-Rad afin de mesurer le niveau de phosphorylation des MAPKs ERK 1/2 et p38.

2.3.4 Effet de la PTHrP (1-34) et d'un inhibiteur de MAPK (PD98059) sur l'activation de ERK1/2

Compte tenu que MEK1/2 se situe en amont de ERK1/2 dans la cascade d'activation de cette MAPK, l'utilisation d'un inhibiteur dirigé contre MEK1/2 va aussi occasionner l'inhibition de ERK1/2. La méthode utilisée ici va nous permettre d'observer si une concentration de 10^{-8} M de PTHrP (1-34) permet de réactiver cette voie de signalisation à court terme. Suite à l'isolation des trophoblastes humains, les cellules sontensemencées à une densité de $4,5 \times 10^6$ cellules dans des boîtes de Pétri de 35 mm pour 5 heures à 37°C en présence d'un milieu de culture complet afin de permettre leur attachement. Par la suite, le milieu est retiré et remplacé par un milieu de culture sans sérum pour la nuit. Après 24 heures de culture *in vitro*, les cellules trophoblastiques sont incubées avec 50 μ M de PD98059, un inhibiteur de MEK1/2, pour 1 heure à 37°C. Le milieu de culture (10% de FBS, SITE-3 ou PTHrP 10^{-8} M) est ensuite ajouté pour différents intervalles de temps (0, 2, 5, 10, 20, 30 et 60 minutes). La réaction est arrêtée suite à l'aspiration du milieu de culture et à la lyse des cellules pour en extraire les protéines. Le niveau de phosphorylation de ERK1/2 sera analysée par immunobuvardage de type Western tel que décrit en 2.3.3.

2.4 Effet de la PTHrP sur le transport calcique des trophoblastes humains

2.4.1 Captation de calcium

Afin de quantifier l'incorporation de l'ion calcique par les trophoblastes, du calcium radiomarké ($^{45}\text{CaCl}_2$, ICN Biochemicals-Irvine) a été utilisé. Après quatre jours de culture *in vitro* dans des plaques 24 puits, les cellules ont été lavées deux fois avec du HBSS contenant 1,26 mM de CaCl_2 et 10mM de Hépès et équilibrées avec ce milieu pour 10 minutes. Par la suite, les trophoblastes ont été incubés à 37°C pour différents intervalles de temps (0, 30 secondes, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30 et 45 minutes) suite à l'addition de HBSS contenant du $^{45}\text{CaCl}_2$ (2-4 $\mu\text{Ci/puit}$). L'incubation est arrêtée par l'aspiration du milieu, suivi de trois lavages avec du PBS froid contenant 4 mM de EGTA. Les cellules sont par la suite

solubilisées dans 500 μL de NaOH 0,5 M et la radioactivité a été mesurée par un compteur de β -scintillation 1.400TM (Perkin Elmer). La quantité de protéines contenues dans chaque puits est ensuite analysée par spectrophotométrie (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad) en utilisant les solutions BCA (Pierce). La captation du calcium est exprimée en nmole de Ca^{2+} /mg de protéines cellulaires.

2.4.2 Analyse par immunobuvardage (Western Blot)

L'extraction des protéines cellulaires a été effectuée selon la méthode exposée en 2.3.2. L'expression des protéines impliquées dans le transport du calcium est observée telle que décrite en 2.3.3 à quelques différences près. Les protéines cellulaires (16,6 μg) sont séparées par un gel SDS-PAGE de 8% pour PMCA1/4 et de 10% pour TRPV6, TCTP et PMCA2. L'incubation du premier anticorps se fait sous agitation à 4°C au cours de la nuit (1/1000 pour anti-TRPV6, TCTP et PMCA1/4) ou 2 heures à température ambiante pour PMCA2 (1/1500). Suite aux lavages avec TBS-T, il y a incubation du deuxième anticorps. Il y a incubation avec l'IgG anti-lapin (1/2500) pour 2 heures 30 minutes suite à TRPV6 et de 1 heure 30 minutes pour TCTP, alors que l'incubation avec PMCA2 est suivie de l'IgG anti-lapin (1/2000) pour 2 heures. Une incubation avec l'IgG anti-souris fait suite à PMCA1/4 (1/2000) pour 3 heures. Après avoir enlevés les anticorps primaires et secondaires lors d'une incubation de 10 minutes avec une solution contenant de la glycine et du SDS, les membranes sont mises en contact avec un nouvel anticorps, soit anti-GAPDH. Ainsi, anti-GAPDH (1/5000) est incubé sous agitation à 4°C au cours de la nuit, puis, suite aux lavages avec TBS-T, il y a incubation avec l'IgG anti-souris (1/10 000) pour 1 heure. La densitométrie est ensuite calculée à l'aide du logiciel Quantity One de Bio-Rad afin de mesurer l'expression des différentes protéines.

2.4.3 Extraction d'ARN, transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel

L'expression des protéines impliquées dans le transport du calcium est aussi étudiée au niveau génique. Ainsi, l'ARNm total fut isolé au premier et quatrième jour de culture *in vitro* grâce au High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics) selon les instructions du manufacturier. Par la suite, 0,5 µg d'ARN a été transcrit en ADN complémentaire (ADNc) avec le Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics) dans un volume final de 20 µL. Les réactions de PCR en temps réel furent exécutées dans un LightCycler® 480 (Roche Diagnostics) avec 0,5 µM de chacune des amorces nécessaires (tableau 2.2) et du SYBR Green I Master (Roche Diagnostics). Un contrôle négatif ne contenant pas d'ADNc fut inclus à chacune des réactions effectuées. L'amplification du gène 18S est utilisé comme contrôle interne afin de quantifier l'expression d'un gène cible.

Tableau 2.2 : Amorces sens et anti-sens des gènes codant pour les protéines impliquées dans le transport du calcium

Gène	Amorces	
	Sens	Anti-sens
TRPV5	5'-AGA CAA GGA GGA TGA CCA GGA G-3'	5'-GAA GCA GTT TTG TGG GAC CC-3'
TRPV6	5'-TCT GCG GAC GGG AGT ATG G-3'	5'-AGG TTG CGA TGC GTG TCC-3'
CaBP9k	5'-ATA TGC AGC CAA AGA AGG TG-3'	5'-GGG TCA AAT GAG TTT CCA GGT-3'
TCTP	5'-AAT CAA GCA CAT CCT TGC TAA T-3'	5'-CAA CGA GAT AAC CTG ATG GCA-3'
PMCA1	5'-CAG CAG GAG AAC CAG AAC CA-3'	5'-TTC ACA GTC TCC CGA CCT TA-3'
PMCA4	5'-TCA GGA ATC CCA ACG GTG- 3'	5'-CCA TGC GTG ACA GTA GCT-3'
18S	5'-CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC-3'	5'-CTC GCT TTC GTA AAC GGT T-3'

2.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques utilisées furent One-Way ANOVA combinée à un test de Tukey et le test de t . Des analyses statistiques ont été réalisées par rapport au milieu traditionnel contenant 10% de FBS et par rapport au milieu de remplacement avec SITE-3. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 5.0.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Effet du milieu de culture sans sérum sur la différenciation

Le milieu de croissance utilisé lors de la culture cellulaire des trophoblastes humains contient 10% de sérum de veau fœtal (FBS). Toutefois, il est impossible de connaître la quantité exacte d'une hormone ou d'un facteur de croissance en particulier contenu dans ce sérum. Comme un des buts de cette étude consistait à déterminer l'effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation des trophoblastes humains, la première étape du projet fut donc de trouver un milieu de culture de remplacement ne contenant pas de sérum de veau fœtal ou en contenant en très faible quantité, ne favorisant pas la différenciation cellulaire et auquel il est possible d'ajouter des concentrations connues de l'hormone à l'étude. Le produit utilisé est le SITE-3 qui contient plusieurs éléments importants pour la croissance cellulaire (tableau 2.1). La survie et la différenciation des trophoblastes alors qu'ils se retrouvent dans différentes conditions de culture furent comparées à celles qu'il est possible d'observer lorsque ce type de cellules est cultivé dans un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal.

Les résultats obtenus avec le milieu de culture contenant 10% de sérum de veau fœtal ont servi de références pour les autres milieux de culture à l'étude. Le dosage de la hCG est un indice de la différenciation des trophoblastes au niveau biochimique, alors que l'immunofluorescence permet d'observer la différenciation de ces cellules grâce à leur morphologie cellulaire en mettant en évidence la formation de syncytiums. Ainsi, au quatrième jour de culture, il est possible d'observer le tapis de trophoblastes formant plusieurs syncytiums, ce qui signifie qu'il y a eu différenciation en ST (figure 3.1A). On considère un syncytium lorsqu'il y a présence de plus de trois noyaux dans une même cellule (Daoud et al., 2005). De même, nous savons que la sécrétion de hCG est beaucoup plus importante au troisième et quatrième jour, ce qui va de pair avec la différenciation cellulaire

(Daoud et al., 2005). Suite à l'utilisation d'un milieu contenant 1% de SITE-3, on ne retrouvait qu'un très faible nombre de cellules après quatre jours de culture (figure 3.1B). La figure 3.2 montre que, pour cette condition, la sécrétion de hCG augmente au troisième jour, puis connaît une diminution au quatrième. La figure 3.1C nous permet d'observer un très faible nombre de cellules lorsque les trophoblastes sont en contact avec un milieu additionné de 10% de SITE-3. De la même manière, le dosage de la hCG lors des deux derniers jours de culture cellulaire montre une faible sécrétion hormonale (figure 3.2). Lorsque les trophoblastes sont cultivés le premier jour avec un milieu contenant 10% de sérum, puis avec un milieu contenant 1% de SITE-3 pour les trois jours suivants, nous pouvons observer un tapis cellulaire uniforme (figure 3.1D). De plus, la sécrétion hormonale de hCG est faible et ne connaît pas d'augmentation au troisième et quatrième jour de culture (figure 3.2). Une autre condition étudiée était de cultiver les trophoblastes avec un milieu contenant 0,5% de sérum de veau fœtal pour 24 heures, puis avec un milieu contenant 1% de SITE-3. L'immunofluorescence effectuée au quatrième jour de culture permet d'observer un tapis cellulaire discontinu avec un faible nombre de ST (figure 3.1E). La sécrétion de hCG augmente au troisième jour, puis diminue au quatrième jour de culture, tout en restant cependant inférieure à celle des trophoblastes cultivés avec 10% de sérum de veau fœtal (figure 3.2). Un milieu additionné d'une faible concentration de sérum de veau fœtal (0,5%) et de SITE-3 (1%) fut aussi étudié. Après quatre jours de culture, la morphologie cellulaire des trophoblastes montre un tapis cellulaire ne comprenant que très peu de ST (figure 3.1F). Cette condition de culture permet toutefois une importante sécrétion de hCG (figure 3.2).

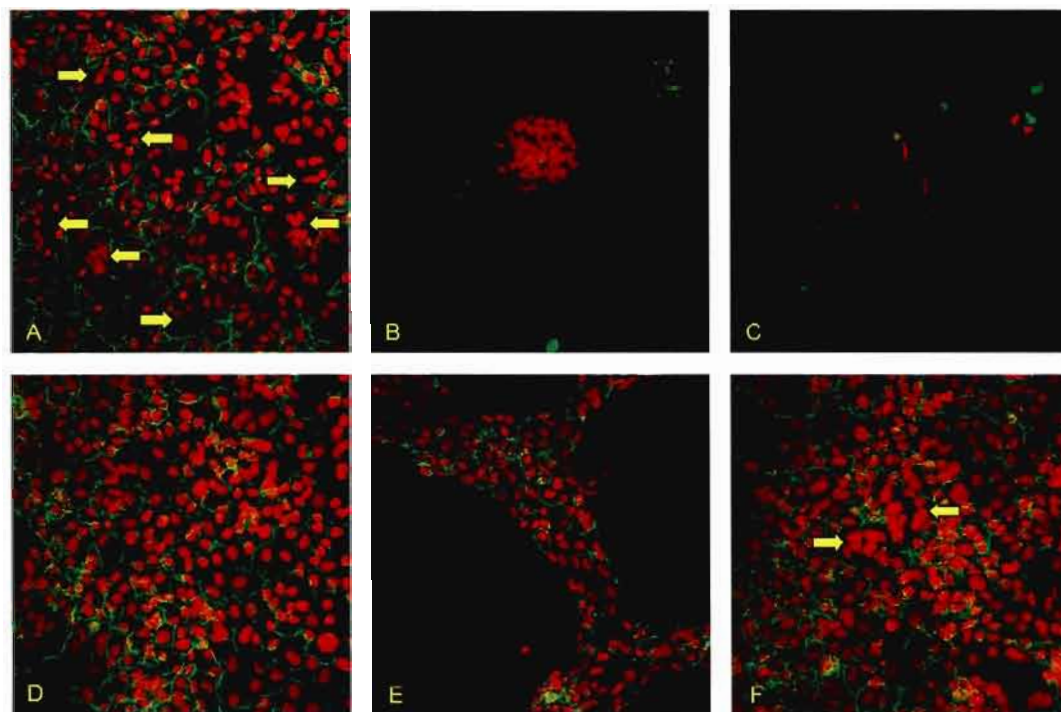


Figure 3.1 : Effet de différents milieux de culture sur la morphologie cellulaire des trophoblastes humains au quatrième jour de culture *in vitro*

Trophoblastes maintenus en culture cellulaire durant quatre jours selon différentes conditions : A, milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal; B, milieu contenant 1% de SITE-3; C, milieu de culture contenant 10% de SITE-3; D, milieu avec 10% de sérum de veau fœtal pour le premier jour de culture et contenant 1% de SITE-3 pour les trois jours suivants; E, milieu avec 0,5% de sérum de veau fœtal pour le premier jour de culture et contenant 1% de SITE-3 pour les trois jours suivants; F, milieu de culture contenant 0,5% de sérum de veau fœtal et 1% de SITE-3. Les cellules ont été fixées avec du méthanol puis marquées grâce à un anticorps spécifique pour la desmoplakine (vert) et avec de l'iodure de propidium pour mettre en évidence les noyaux (rouge). Les observations ont été faites à 400X à l'aide d'un microscope confocal. Les flèches jaunes indiquent la formation de syncytium, c'est-à-dire lorsqu'il y a présence de plus de trois noyaux dans une même cellule. Les images sont représentatives de photos provenant de cellules isolées à partir de deux placentas, n=2.

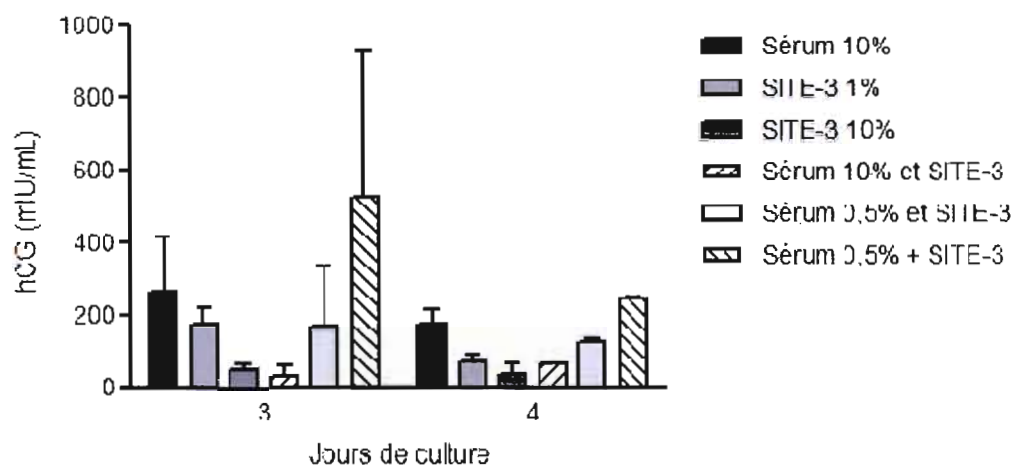


Figure 3.2 : Effet de différents milieux de culture sur la sécrétion hormonale de gonadotropine chorionique humaine (hCG)

Cellules trophoblastiques cultivées selon différentes conditions durant quatre jours afin d'évaluer leur sécrétion de hCG au troisième et quatrième jour de culture. Les données sont représentatives des sécrétions cellulaires provenant de cellules isolées à partir de deux placentas, n=2.

Ainsi, un milieu où les trophoblastes sont tout d'abord en contact avec une concentration de 10% de sérum de veau fœtal pour la première journée, remplacé par la suite par un milieu sans sérum (SITE-3 1%) fut choisi pour étudier l'effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation et le transport calcique des trophoblastes humains.

3.2 Viabilité cellulaire

Afin de s'assurer que le supplément SITE-3 et l'ajout de PTHrP (1-34) n'affecteraient pas la viabilité cellulaire, un essai de cytotoxicité a tout d'abord été effectué pour les quatre jours de culture. Pour cela, la libération de LDH dans le milieu de culture a été mesurée et les résultats obtenus sont représentés à la figure 3.3. La sécrétion de LDH des cellules traitées est similaire à celle des cellules contrôles maintenues en culture pour quatre jours avec un milieu contenant 10% de FBS. Ainsi, les différents traitements n'affectent pas la viabilité cellulaire.

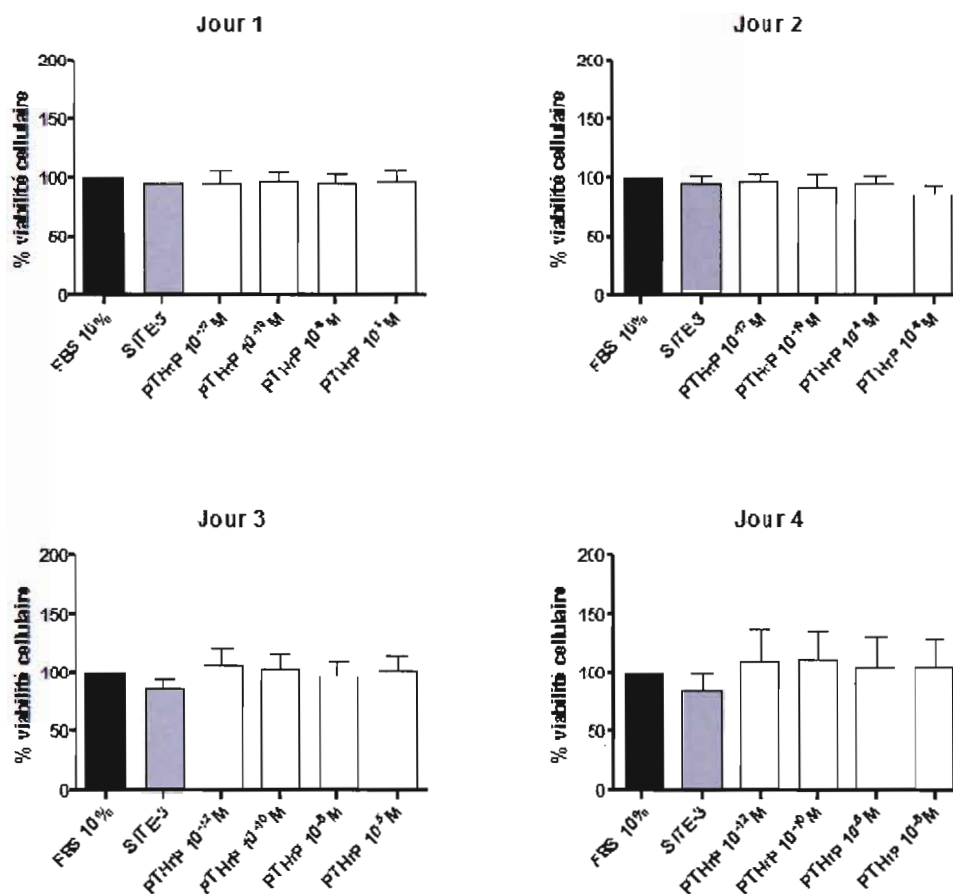


Figure 3.3 : Effet de la PTHrP (1-34) sur la viabilité cellulaire

Les cellules trophoblastiques ont été cultivées avec un milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal pour les 24 premières heures, puis remplacé par un milieu ne contenant pas de sérum, mais additionné de SITE-3 pour les trois jours suivants. Différentes concentrations de PTHrP (1-34) ont été ajoutées à chaque jour. Les données représentent la libération de lactate déshydrogénase (LDH) comparée au contrôle (FBS 10%). Les résultats sont représentatifs d'expériences effectuées sur des cellules isolées à partir de trois placentas, n=3.

3.3 Effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation des trophoblastes humains

L'observation morphologique des trophoblastes humains en culture *in vitro* est un moyen de vérifier s'il y a eu différenciation en ST. Suite à quatre jours de culture avec un milieu

contenant du sérum de veau fœtal, les CT humains se différencient en ST, ce qui est observable à la figure 3.4A. Toutefois, il est possible de constater que le remplacement du sérum de veau fœtal par le supplément SITE-3 ne permet pas cette différenciation cellulaire (figure 3.4B). Ainsi, les trophoblastes forment un tapis unicellulaire sans la formation de syncytium. L'ajout de 10^{-12} M de PTHrP (1-34) n'affecte pas la différenciation des trophoblastes humains puisqu'il n'y a pas formation de ST (figure 3.4C). Toutefois, l'ajout d'une concentration légèrement plus élevée de PTHrP, soit 10^{-10} M, permet la formation de petits syncytiums (figure 3.4D). Les figures 3.4E et F montrent bien que la présence de 10^{-8} et 10^{-6} M de PTHrP (1-34) induit la formation de nombreux syncytiums.

Une seconde manière d'observer la différenciation cellulaire des trophoblastes humains est de mesurer la sécrétion de hCG, un marqueur biochimique de ce type de différenciation cellulaire. À la figure 3.5, il est possible de constater que, au premier et deuxième jour de culture, la sécrétion de hCG par les cellules traitées est similaire à celle retrouvée chez les cellules contrôles. Au quatrième jour de culture, il est possible d'observer une diminution significative de la sécrétion de hCG par les trophoblastes cultivés en présence de SITE-3 seulement. Cependant, au troisième jour, l'ajout de concentrations croissantes de PTHrP (1-34) semble permettre d'augmenter la sécrétion de hCG et ce, de manière dose-dépendante, bien que cela ne soit pas significatif.

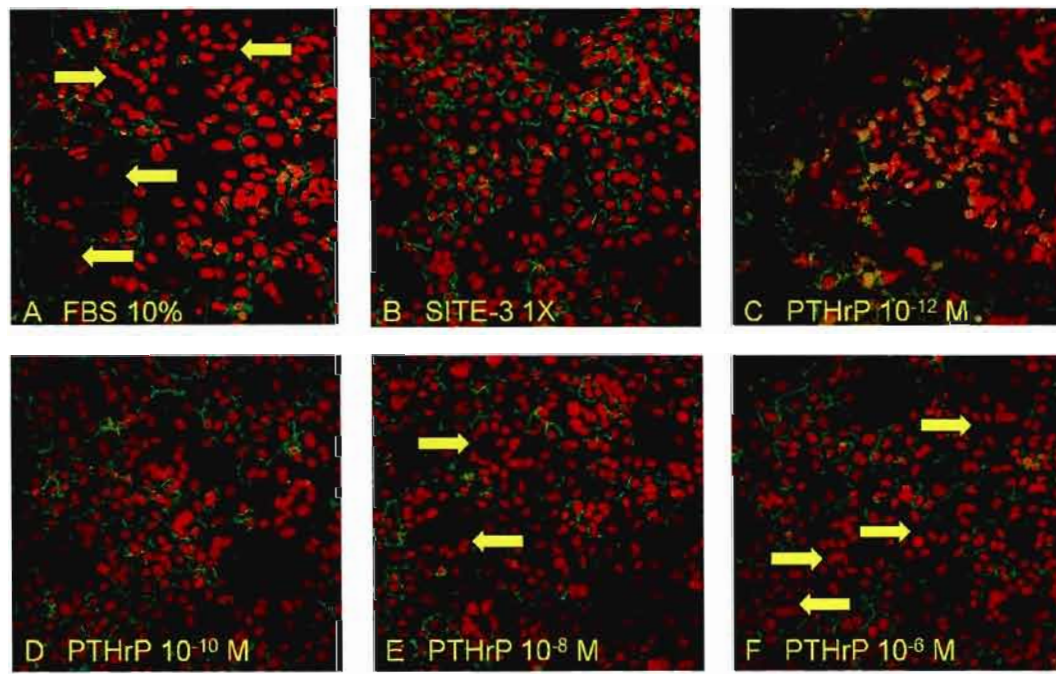


Figure 3.4 : Effet de la PTHrP (1-34) sur la morphologie cellulaire des trophoblastes humains au quatrième jour de culture *in vitro*

Trophoblastes maintenus en culture cellulaire durant quatre jours selon différentes conditions : A, milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal; B, milieu avec 10% de sérum de veau fœtal pour le premier jour de culture, puis remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3; C, milieu avec 10% de sérum de veau fœtal et additionné de 10^{-12} M de PTHrP (1-34) pour le premier jour de culture, puis remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3 et additionné de 10^{-12} M de PTHrP (1-34); D, milieu avec 10% de sérum de veau fœtal et additionné de 10^{-10} M de PTHrP (1-34) pour le premier jour de culture, puis remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3 et additionné de 10^{-10} M de PTHrP (1-34); E, milieu avec 10% de sérum de veau fœtal et additionné de 10^{-8} M de PTHrP (1-34) pour le premier jour de culture, puis remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3 et additionné de 10^{-8} M de PTHrP (1-34); F, milieu avec 10% de sérum de veau fœtal et additionné de 10^{-6} M de PTHrP (1-34) pour le premier jour de culture, puis remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3 et additionné de 10^{-6} M de PTHrP (1-34). Les cellules ont été fixées avec du méthanol puis marquées grâce à un anticorps spécifique pour la desmoplakine (vert) et avec de l'iodure de propidium pour mettre en évidence les noyaux (rouge). Les observations ont été faites à 400X à l'aide d'un microscope confocal. Les flèches jaunes indiquent la formation de syncytium, c'est-à-dire lorsqu'il y a présence de plus de trois noyaux dans une même cellule. Les images sont représentatives de photos provenant de cellules isolées à partir de trois placentas, n=3.

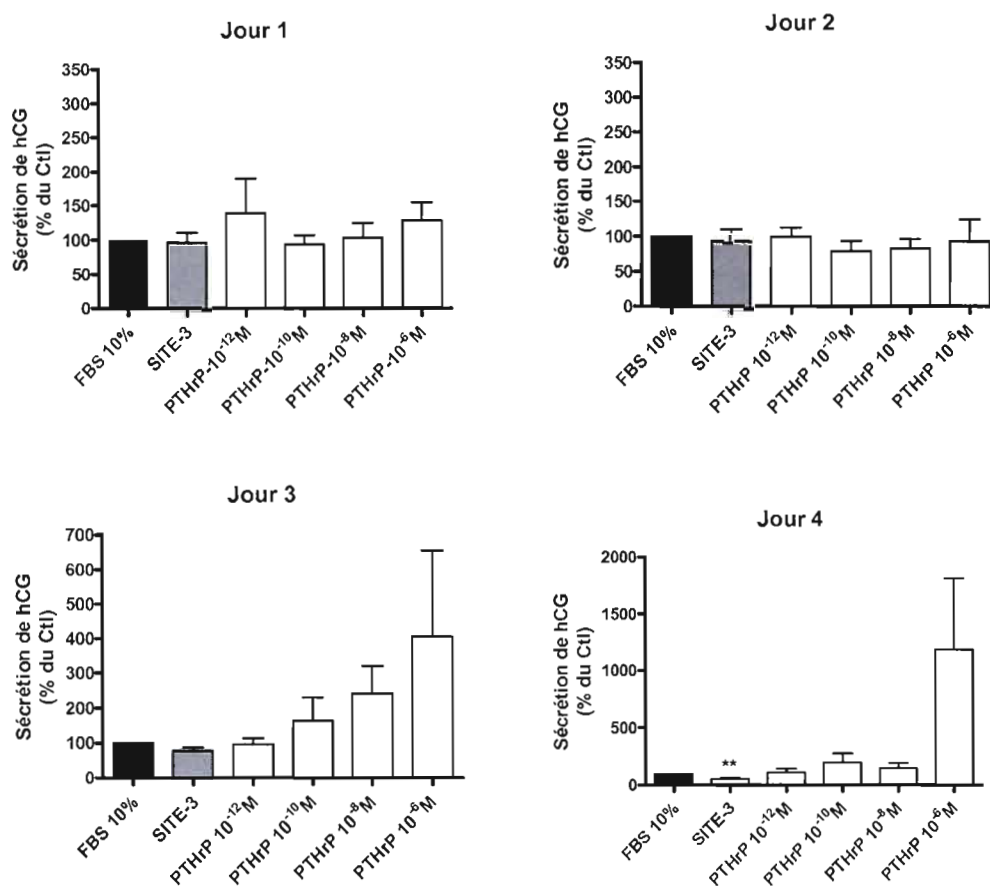


Figure 3.5 : Effet de la PTHrP (1-34) sur la sécrétion hormonale de gonadotrophine chorionique humaine (hCG)

Cellules trophoblastiques cultivées selon différentes conditions durant quatre jours afin d'évaluer leur sécrétion de hCG aux quatre jours de culture. Les résultats représentent la sécrétion de hCG comparée au contrôle. Les données sont représentatives des sécrétions cellulaires provenant de cellules isolées à partir de six placentas, n=6. **p < 0,01 comparé au contrôle FBS 10%, t-test.

3.4 Effet de la PTHrP (1-34) sur l'activation des MAPKs ERK1/2 et p38

3.4.1 Effet de la PTHrP sur l'activation de p38

Par la suite, l'activation de la MAPK p38 suite aux différents traitements à la PTHrP, soit son niveau de phosphorylation, a été observée. Ainsi, les différentes conditions étudiées ne semblent pas modifier l'activation de cette MAPK au cours des quatre jours de culture (figure 3.6). Toutefois, au premier jour de culture, la présence d'une concentration de 10^{-6} M de PTHrP (1-34) dans le milieu diminue de manière significative l'activation de p38 comparée au milieu contenant 10% de FBS, alors qu'il n'y a pas de différence significative avec le milieu avec SITE-3. De plus, l'activation de cette MAPK pour les cellules trophoblastiques en culture avec le milieu traditionnel demeure similaire au cours des quatre jours de culture *in vitro*.

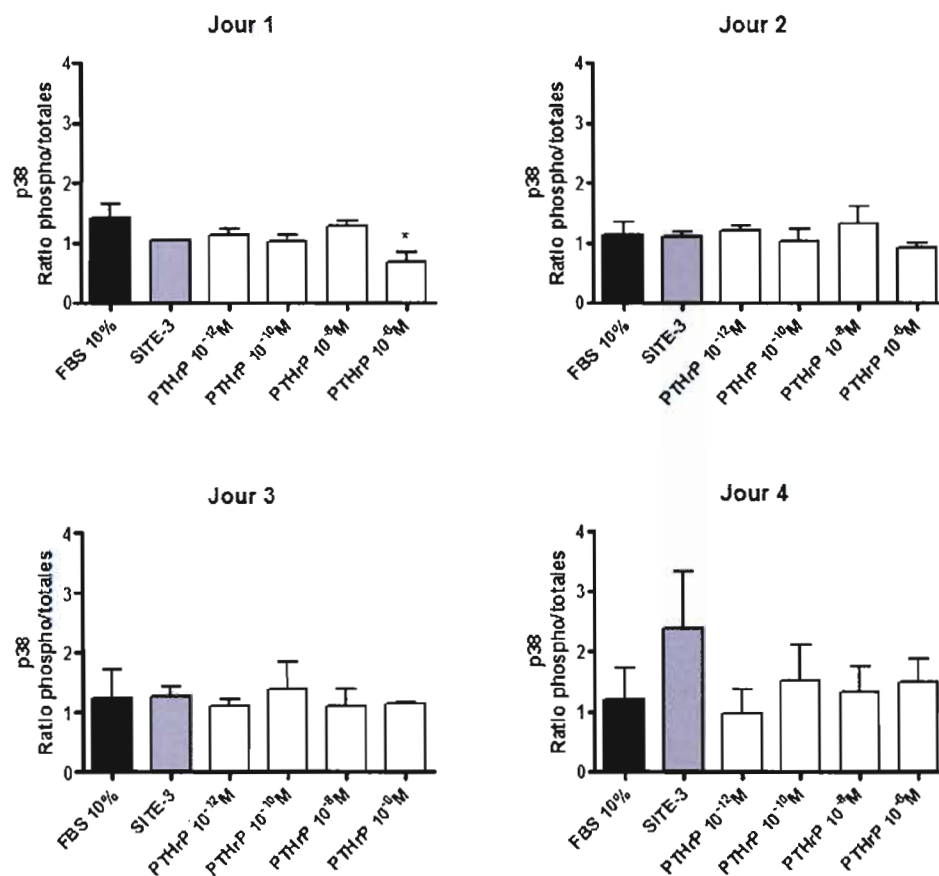


Figure 3.6 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'activation de p38 dans les trophoblastes humains au cours de la culture cellulaire

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée avec un anticorps dirigé contre phospho-p38, p38 ou GAPDH sur des extraits de protéines totales isolées à partir de culture de trophoblastes aux quatre jours de culture. Représentation densitométrique de l'activation de p38 détectée par Western Blot suite à la normalisation avec le niveau total de p38. Les résultats sont représentatifs d'expériences effectuées sur des cellules isolées à partir de trois placentas, n=3. *P < 0,05 comparé au contrôle FBS 10%, one-way ANOVA.

3.4.2 Effet de la PTHrP sur l'activation de ERK1/2

Afin de déterminer de quelle manière le fragment N-terminal de la PTHrP agit, l'activation de la MAPK ERK1/2 a aussi été mesurée suite aux différents traitements administrés et ce, aux quatre jours de culture. Ainsi, l'ajout de concentrations croissantes de PTHrP (1-34) au milieu sans sérum avec SITE-3 permet d'augmenter la phosphorylation de ERK1/2, c'est-à-dire son niveau d'activation (figure 3.7). En effet, au premier jour de culture, une dose de 10^{-6} M de PTHrP (1-34) et une concentration de 10^{-8} M de PTHrP (1-34) au quatrième jour de culture augmentent de manière significative l'activation de cette MAPK par rapport au contrôle avec SITE-3.

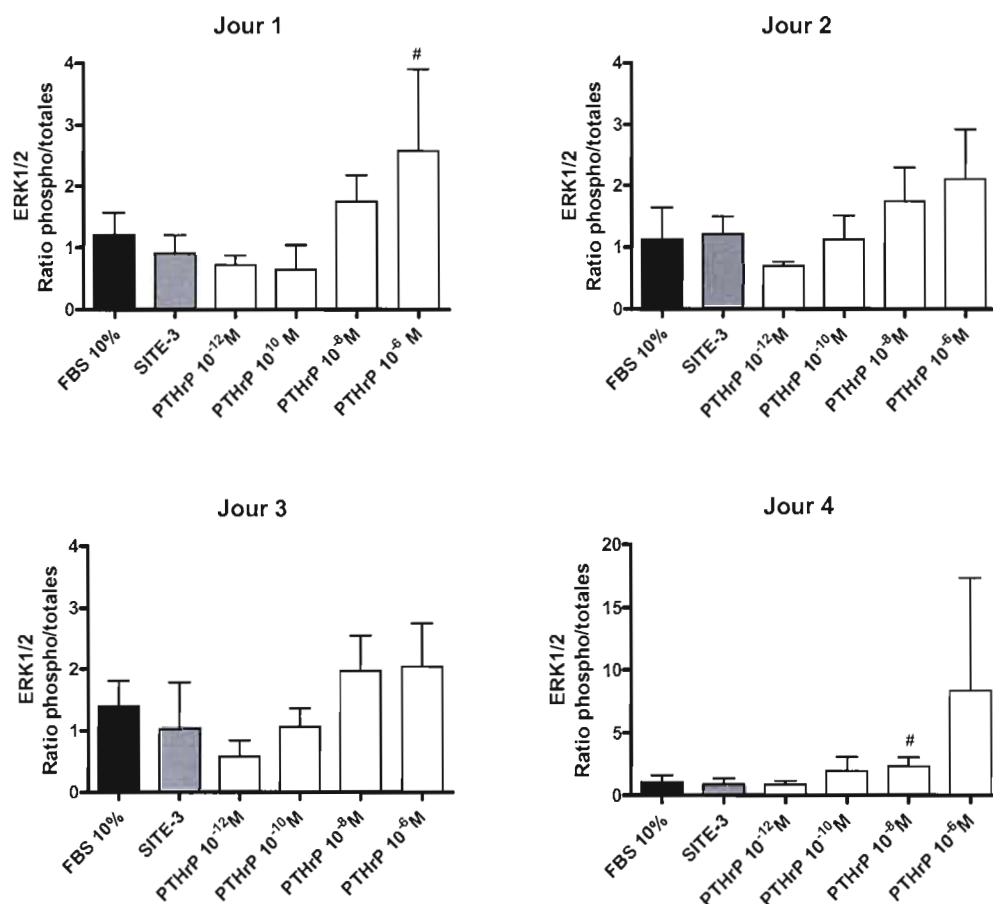


Figure 3.7 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'activation de ERK1/2 dans les trophoblastes humains au cours de la culture cellulaire

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée avec un anticorps dirigé contre phospho-ERK1/2, ERK1/2 ou GAPDH sur des extraits de protéines totales isolées à partir de culture de trophoblastes aux quatre jours de culture. Représentation densitométrique de l'activation de ERK1/2 détectée par Western Blot suite à la normalisation avec le niveau total de ERK1/2. Les résultats sont représentatifs d'expériences effectuées sur des cellules isolées à partir de trois placentas, n=3. #P < 0,05 comparé au contrôle SITE-3, one-way ANOVA.

Il a déjà été démontré que le sérum de veau fœtal peut réactiver la voie de signalisation des MAPKs ERK1/2 suite à l'inhibition de l'activation de MEK1/2 après 24 heures de culture *in vitro* (Daoud et al., 2005). Il était donc judicieux d'étudier la capacité de la PTHrP (1-34) à réactiver cette voie de la même manière. Ainsi, lorsque les cellules sont privées de sérum pour la nuit, puis incubées en présence de cet inhibiteur pour une heure, il est possible de constater à la figure 3.8A que l'inhibiteur de MEK1/2 PD98059 empêche effectivement l'activation de ERK1/2 lorsqu'il n'y a aucune stimulation (0 minute). Toutefois, une stimulation avec le sérum de veau fœtal permet la réactivation de la voie avec un maximum d'activation 5 minutes après l'ajout du sérum, ce qui équivaut à une activation 9 fois plus importante comparée au niveau sans stimulation (0 minute). Une heure après la stimulation, l'activation de ERK1/2 est presque totalement abolie. La stimulation avec un milieu de culture sans sérum mais additionné de SITE-3 permet aussi une réactivation de la voie de signalisation de ERK1/2, mais de manière moins importante (figure 3.8B). En effet, ce traitement active deux fois moins cette MAPK comparé au milieu avec sérum. Le maximum d'activation est toujours atteint entre 2 et 10 minutes. L'ajout d'une concentration de 10^{-8} M de PTHrP (1-34) à ce milieu de culture ne semble toutefois pas permettre une activation plus importante de la voie de ERK1/2 (figure 3.8C). Il est cependant possible d'observer une diminution significative de l'activation de ERK1/2 avant l'ajout du milieu (temps 0) et une augmentation de la phosphorylation suite à l'ajout du milieu avec PTHrP (1-34). Par la suite, il y a une diminution significative de l'activation qui survient après 30 minutes et qui est soutenue jusqu'à 60 minutes.

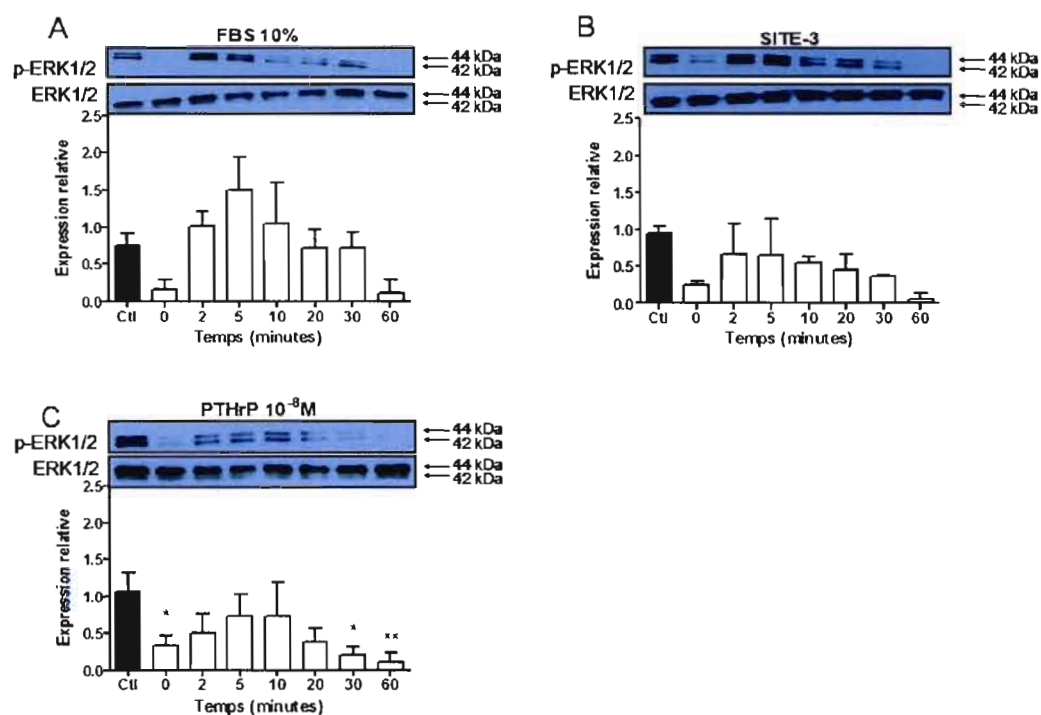


Figure 3.8 : Effet de la PTHrP (1-34) et de l'inhibiteur PD98059 sur l'activation de ERK1/2 dans les trophoblastes humains en culture

Suite à l'isolation des trophoblastes, les cellules sont cultivées avec un milieu additionné de sérum de veau fœtal, puis ce milieu est remplacé par un milieu sans sérum pour la nuit. Hormis les cellules contrôles (sans l'inhibiteur PD98059), les trophoblastes sont ensuite incubés avec l'inhibiteur PD98059 (50 μ M) pour 1 heure, puis stimulées pour différents intervalles de temps avec le sérum de veau fœtal (A), le milieu sans sérum additionné de SITE-3 (B) ou la PTHrP (1-34) 10^{-8} M (C). Suite à la stimulation, les cellules sont lysées et les protéines sont séparées par électrophorèse. L'activation de ERK1/2 est détectée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps dirigé contre phospho ERK1/2 ou ERK1/2 sur des extraits de protéines totales (15,0 μ g). Les analyses densitométriques représentent l'activation de ERK1/2 suite à la normalisation avec le niveau total de ERK1/2. Les expérimentations ont été effectuées sur des cellules isolées à partir de trois placentas, n=3. *P < 0,05, **P < 0,01 comparés au contrôle (cellules trophoblastiques incubées avec sérum, sans inhibiteur), one-way ANOVA.

3.5 Effet de la PTHrP (1-34) sur le transport calcique des trophoblastes humains

La captation du calcium radiomarké par les ST donne une représentation de la dynamique de l'homéostasie calcique, c'est-à-dire où il y a entrée et sortie du calcium. La cinétique linéaire des cinq premières minutes représente la captation du calcium, alors que le plateau est relié à l'atteinte d'un équilibre entre l'entrée et la sortie de calcium radiomarké par le ST (Moreau et al., 2003). Le niveau de calcium mesuré dans la phase plateau est aussi en lien avec la rétention du calcium par la cellule qui dépend de facteurs tels son interaction avec des protéines intracellulaires ou sa séquestration dans des compartiments intracellulaires. À la figure 3.9, il est possible d'observer qu'après 10 minutes d'incubation avec le $^{45}\text{Ca}^{2+}$, la captation du calcium semble atteindre le début d'un plateau. En effet, le graphique montre encore une certaine augmentation de la captation du calcium. Lorsque le sérum de veau fœtal est remplacé par le supplément SITE-3, il y a une augmentation non significative de la captation du calcium. L'ajout de 10^{-8} M de PTHrP (1-34) à ce milieu de culture augmente encore plus la captation du calcium radiomarké sans toutefois permettre l'atteinte d'un plateau. Il est aussi possible de noter une augmentation significative de la captation du calcium pour les cellules traitées avec la PTHrP (1-34) à 10 minutes par rapport aux cellules contrôles cultivées avec FBS 10%.

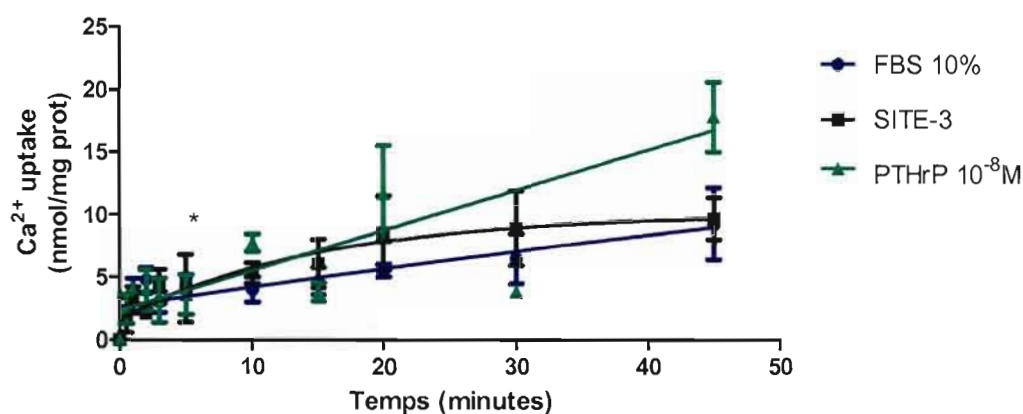


Figure 3.9 : Effet de la PTHrP (1-34) sur la captation du calcium par les syncytiotrophoblastes

Le comptage de la captation du calcium a été réalisé par β -scintillation. La captation du calcium radiomarqué est exprimée en nmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ par mg de protéines cellulaires. La captation de calcium a été mesurée dans des cellules isolées à partir de trois placentas, $n=3$. * $P < 0,05$, PTHrP (1-34) 10^{-8} M comparé à FBS 10%, t -test.

3.5.1 Modulation génique des protéines impliquées dans le transport du calcium

3.5.1.1 TRPV5

L'expression de l'ARNm de TRPV5 semble diminuer légèrement au quatrième jour de culture par rapport au premier. Toutefois, le remplacement du sérum de veau fœtal par le supplément SITE-3 induit une augmentation non significative de l'expression génique de ce canal au premier comme au quatrième jour de culture *in vitro*. L'ajout de concentrations croissantes de PTHrP (1-34) ne modifie pas de manière significative l'expression de l'ARNm de TRPV5 lorsque les cellules trophoblastiques sont différenciées (Jour 4). Au premier jour de culture, de faibles concentrations du fragment N-terminal de la PTHrP (10^{-12} et 10^{-10} M) semblent induire une expression plus faible par rapport au contrôle, alors que de fortes concentrations (10^{-8} et 10^{-6} M) semblent stimuler son expression.

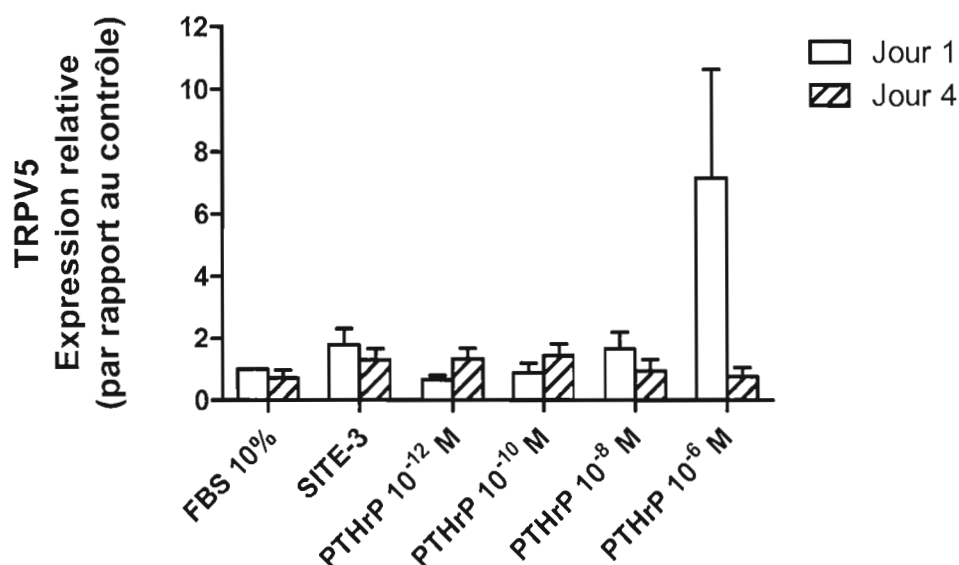


Figure 3.10 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de TRPV5 dans les cellules trophoblastiques humaines

Le niveau d'expression de TRPV5 a été mesuré par PCR en temps réel. Les trophoblastes ont été incubés pour 1 et 4 jours avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). Les données ont été normalisées par rapport au contrôle et l'expression de l'ARNm de TRPV5 a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, $n=4$.

3.5.1.2 TRPV6

L'effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression génique du canal calcique TRPV6 a aussi été mesuré au premier et quatrième jour de culture. Tout d'abord, lorsque les cellules trophoblastiques sont cultivées en présence d'un milieu avec sérum, l'expression de l'ARNm de TRPV6 semble diminuer au quatrième jour comparativement au premier jour de culture cellulaire (figure 3.11). Après 24 heures de culture *in vitro*, les différents traitements ne semblent pas modifier l'expression génique de ce canal. Toutefois, après 4 jours, la présence de faibles concentrations de PTHrP (1-34), soit 10^{-12} et 10^{-10} M, semble permettre une augmentation de son expression génique par rapport au premier jour de traitement ainsi qu'au contrôle (figure 3.11).

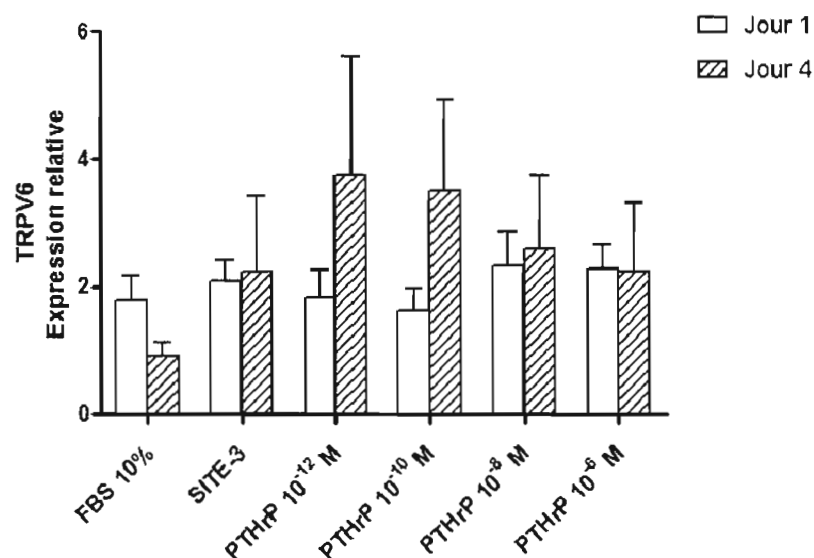


Figure 3.11 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de TRPV6 dans les cellules trophoblastiques humaines

Le niveau d'expression de TRPV6 a été mesuré par PCR en temps réel. Les trophoblastes ont été incubés pour 1 et 4 jours avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de l'ARNm de TRPV6 a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, n=4.

3.5.1.3 TCTP

Par la suite, l'expression génique de la protéine liant le calcium TCTP a été mesurée. Les différents traitements qu'ont subis les cellules trophoblastiques en culture ne modifient pas l'expression de l'ARNm de TCTP (figure 3.12). Toutefois, le temps a un effet significatif sur l'expression génique de cette protéine. En effet, il y a une diminution significative de l'expression de l'ARNm de TCTP au quatrième jour de culture par rapport au premier. De plus, cette différence est retrouvée dans tous les traitements hormis lorsque les cellules sont en présence d'une concentration de 10^{-10} M de PTHrP (1-34).

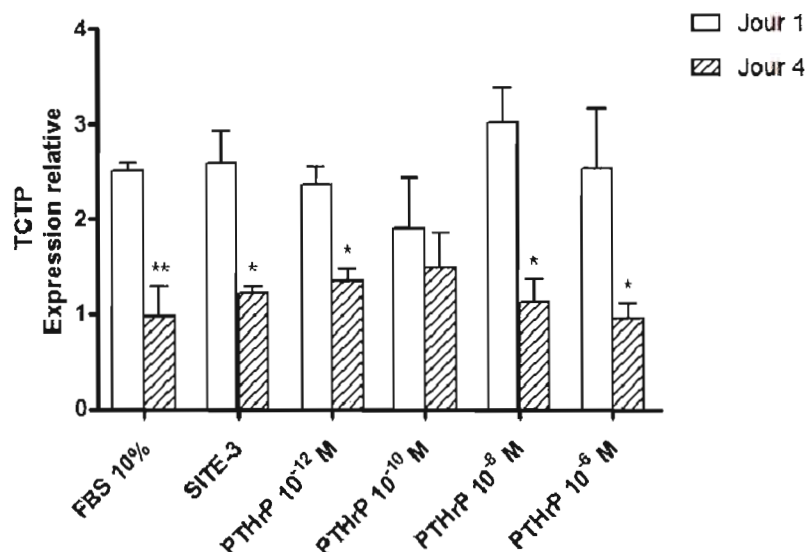


Figure 3.12 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de TCTP dans les cellules trophoblastiques humaines

Le niveau d'expression de TCTP a été mesuré par PCR en temps réel. Les trophoblastes ont été incubés pour 1 et 4 jours avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de l'ARNm de TCTP a été déterminée pour des cellules isolées à partir de trois placentas, $n=3$. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparés au jour 1, t -test.

3.5.1.4 CaBP9k

L'expression de l'ARNm de CaBP9k, une protéine intracellulaire de liaison du calcium, a aussi été mesurée. Lorsque les cellules trophoblastiques sont cultivées avec le milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal, l'expression génique de cette protéine est faible. L'utilisation de notre milieu sans sérum semble toutefois permettre une augmentation de son expression. L'ajout de concentrations croissantes de PTHrP (1-34) semble augmenter l'expression de l'ARNm de la CaBP9k au premier jour de culture, alors que cette stimulation n'est pas retrouvée après quatre jours de culture *in vitro*.

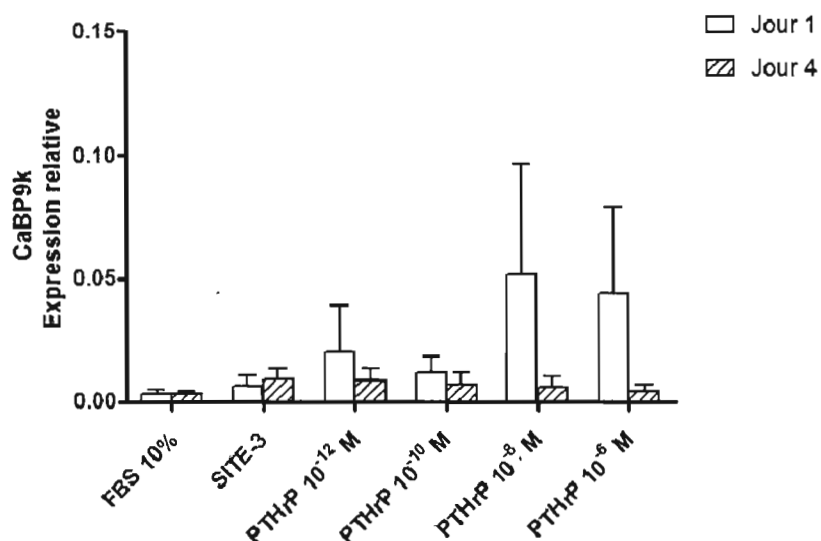


Figure 3.13 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de CaBP9k dans les cellules trophoblastiques humaines

Le niveau d'expression de CaBP9k a été mesuré par PCR en temps réel. Les trophoblastes ont été incubés pour 1 et 4 jours avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de l'ARNm de CaBP9k a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, n=4.

3.5.1.5 PMCA1

PMCA1 est une pompe membranaire utilisant l'ATP pour transférer le calcium intracellulaire vers la circulation fœtale. Les différentes concentrations du fragment N-terminal de la PTHrP ne modifient pas l'expression de son ARNm au premier comme au quatrième jour de culture (figure 3.14). Toutefois, le temps semble influencer sur l'expression génique de PMCA1 puisqu'on retrouve son ARNm en moins grande quantité après quatre jours de culture *in vitro* comparativement au premier jour.

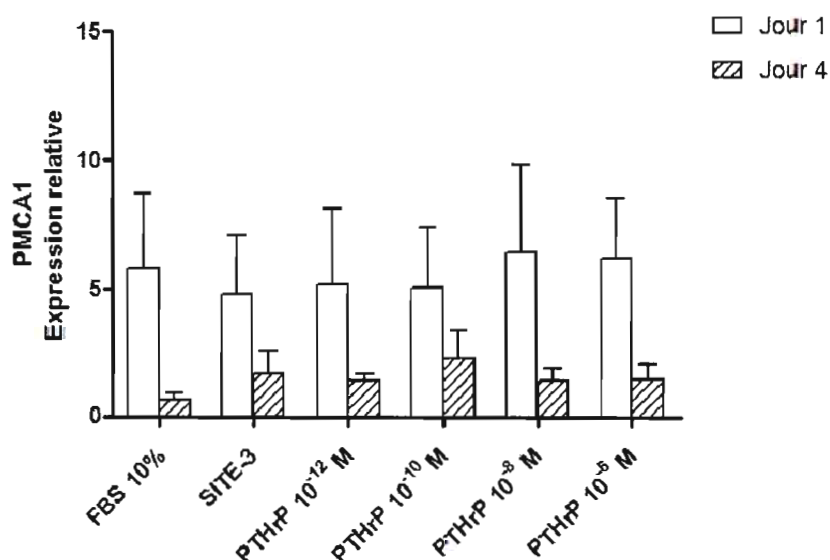


Figure 3.14 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de PMCA1 dans les cellules trophoblastiques humaines

Le niveau d'expression de PMCA1 a été mesuré par PCR en temps réel. Les trophoblastes ont été incubés pour 1 et 4 jours avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de l'ARNm de PMCA1 a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, n=4.

3.5.1.6 PMCA4

PMCA4 est une autre pompe membranaire que nous avons utilisée pour étudier l'effet de la PTHrP (1-34) sur le transport du calcium à travers le placenta. À la figure 3.15, il est possible d'observer que l'omission du sérum dans le milieu de culture semble permettre une augmentation de l'expression génique de PMCA4 au premier jour de culture par rapport au contrôle. Toutefois, l'addition de PTHrP (1-34) à ce milieu sans sérum ne semble pas modifier l'expression de l'ARNm de cette pompe membranaire. L'expression génique de PMCA4 au quatrième jour de culture *in vitro* est inférieure à celle observée au premier jour et ce, pour tous les traitements étudiés et semble aussi être constante pour ces différentes conditions.

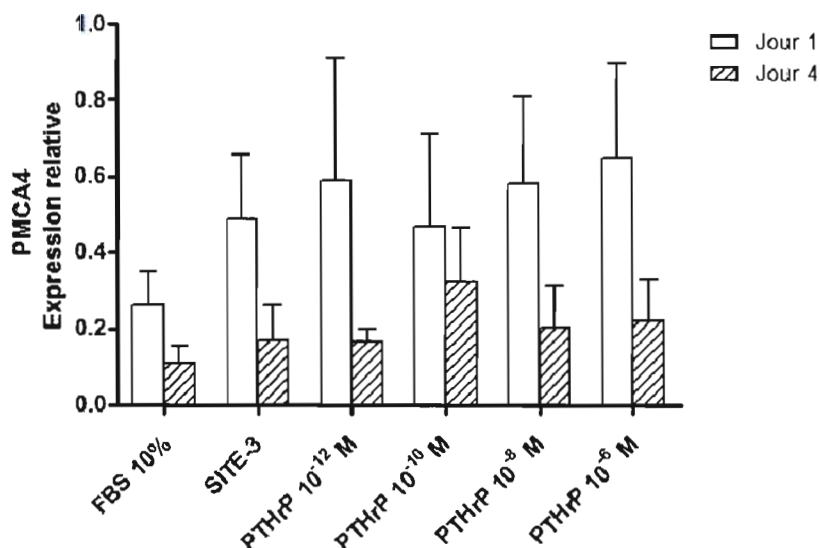


Figure 3.15 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de l'ARNm de PMCA4 dans les cellules trophoblastiques humaines

Le niveau d'expression de PMCA4 a été mesuré par PCR en temps réel. Les trophoblastes ont été incubés pour 1 et 4 jours avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de l'ARNm de PMCA4 a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, $n=4$.

3.5.2 Expression des protéines impliquées dans le transport du calcium

3.5.2.1 TRPV6

L'expression protéinique du canal TRPV6 est représentée à la figure 3.16. Les différents traitements ne modifient pas l'expression de cette protéine au premier jour de culture tout comme au quatrième. La présence de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture semble toutefois permettre une diminution non significative de l'expression de cette protéine au quatrième jour de culture *in vitro*.

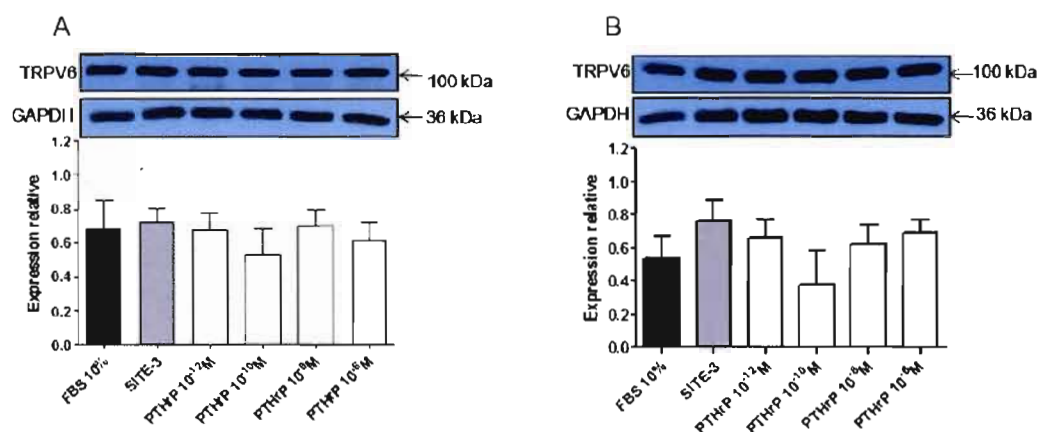


Figure 3.16 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine TRPV6 dans les cellules trophoblastiques humaines

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée avec un anticorps dirigé contre TRPV6 ou GAPDH sur des extraits de protéines totales (16,6 µg) isolées à partir de culture de trophoblastes au jour 1 (A) et 4 (B). Les cellules trophoblastiques ont été cultivées avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de la protéine TRPV6 a été normalisée par rapport à celle de GAPDH et a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, n=4.

3.5.2.2 TCTP

Les niveaux d'expression de TCTP sont similaires pour les premier et quatrième jours de culture (figure 3.17). De plus, les cellules cultivées avec le supplément SITE-3 ou additionnées de PTHrP (1-34) ne montrent pas de variation pour l'expression de cette protéine liant le calcium. Toutefois, il semble y avoir une légère augmentation de son expression pour les cellules trophoblastiques cultivées en présence d'une concentration de 10^{-12} M de PTHrP (1-34) tant au premier qu'au quatrième jour de culture *in vitro*.

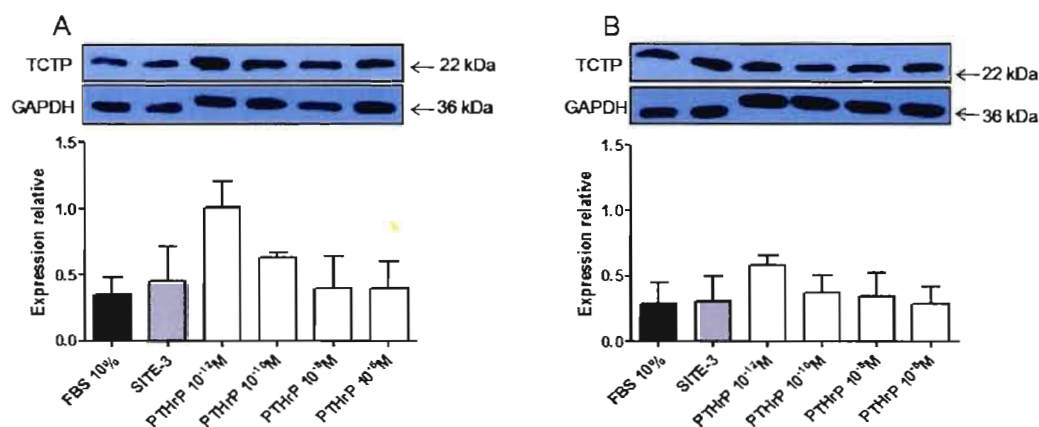


Figure 3.17: Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine TCTP dans les cellules trophoblastiques humaines

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée avec un anticorps dirigé contre TCTP ou GAPDH sur des extraits de protéines totales (16,6 μ g) isolées à partir de culture de trophoblastes au jour 1 (A) et 4 (B). Les cellules trophoblastiques ont été cultivées avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de la protéine TCTP a été normalisée par rapport à celle de GAPDH et a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, $n=4$.

3.5.2.3 PMCA1/4

Les pompes membranaires PMCA1 et 4 utilisent l'ATP pour transférer les ions calciques à la circulation fœtale. L'expression de ces pompes est similaire au premier et au quatrième jour de culture *in vitro*. Toutefois, au premier jour de culture, l'expression de ces protéines est augmentée de manière significative par rapport au contrôle lorsque les trophoblastes sont en présence d'une forte concentration (10^{-6} M) de PTHrP (1-34) (figure 3.18). De plus, l'addition de 10^{-8} ou 10^{-6} M de cette hormone à un milieu sans sérum permet aussi une augmentation significative de l'expression de ces pompes. Cette augmentation n'est cependant pas présente au quatrième jour de culture.

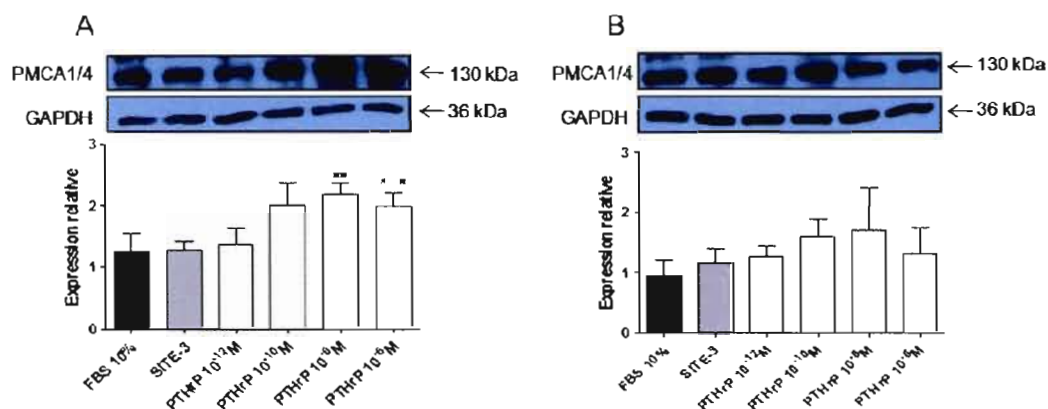


Figure 3.18 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine PMCA1/4 dans les cellules trophoblastiques humaines

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée avec un anticorps dirigé contre PMCA1/4 ou GAPDH sur des extraits de protéines totales (16,6 μ g) isolées à partir de culture de trophoblastes au jour 1 (A) et 4 (B). Les cellules trophoblastiques ont été cultivées avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de la protéine PMCA1/4 a été normalisée par rapport à celle de GAPDH et a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, $n=4$. #P < 0,05, ##P < 0,01 comparé au contrôle SITE-3 et *P < 0,05 comparé au contrôle FBS 10%, *t*-test.

3.5.2.4 PMCA2

PMCA2 est une autre pompe membranaire qui utilise l'ATP pour transporter le calcium intracellulaire vers le fœtus. Cette pompe semble être davantage exprimée au premier jour de culture par rapport au quatrième (figure 3.19). Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les différents traitements, il semble que la présence de faibles concentrations de PTHrP (1-34), soit 10^{-12} et 10^{-10} M, permet une augmentation de l'expression de PMCA2 au premier et quatrième jour de culture.

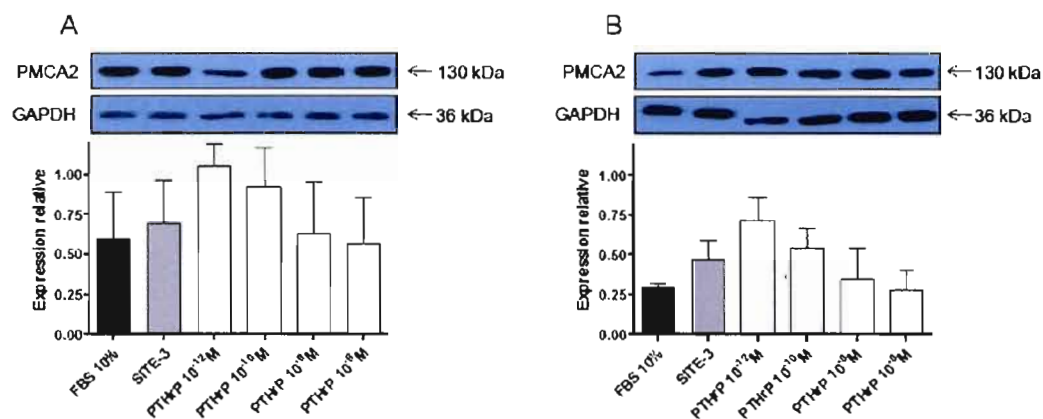


Figure 3.19 : Effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression relative de la protéine PMCA2 dans les cellules trophoblastiques humaines

L'analyse par immunobuvardage de type Western a été réalisée avec un anticorps dirigé contre PMCA2 ou GAPDH sur des extraits de protéines totales (16,6 μ g) isolées à partir de culture de trophoblastes au jour 1 (A) et 4 (B). Les cellules trophoblastiques ont été cultivées avec un milieu de culture avec sérum, un milieu sans sérum mais additionné de SITE-3 ou un milieu sans sérum avec SITE-3 et additionné de différentes concentrations de PTHrP (1-34) (10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} et 10^{-6} M). L'expression de la protéine PMCA2 a été normalisée par rapport à celle de GAPDH et a été déterminée pour des cellules isolées à partir de quatre placentas, n=4.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

4.1 Milieu de culture

La recherche effectuée sur les cellules trophoblastiques est dépendante des milieux de culture utilisés. Le contenu de ces milieux comme les hormones et facteurs de croissance qui sont présents dans le sérum en quantité inconnue va donc influencer la croissance et le développement cellulaire. Par exemple, le sérum est nécessaire à la formation de syncytium chez les cellules trophoblastiques (Kao et al., 1988, Morrish et al., 1997). Ainsi, afin de déterminer l'effet de la PTHrP (1-34) sur la formation des syncytiotrophoblastes humains, il était nécessaire d'omettre tout facteur du milieu de culture pouvant influencer sur ce phénomène.

Un tel milieu avait déjà été mis au point pour la culture *in vitro* de trophoblastes murins (El-Hashash and Kimber, 2004), mais il fut impossible de travailler avec le produit utilisé par cette équipe, celui-ci étant discontinué. Nous avons donc utilisé le supplément SITE-3 (Sigma), ce dernier contenant plusieurs éléments essentiels à la croissance cellulaire et étant le produit le plus similaire à celui utilisé par El-Hashash et Kimber (2004). Il fallait mettre au point un milieu ne permettant pas la différenciation en ST tout en n'affectant pas la viabilité cellulaire.

Les milieux ne contenant que du SITE-3, soit à des concentrations de 1% ou de 10%, ne furent pas considérés comme milieu de remplacement puisqu'ils ne permettaient pas une bonne survie cellulaire, comme le montrent les figures 3.1B et C. La diminution de la sécrétion de hCG qui se produit au quatrième jour lorsque les trophoblastes sont cultivés avec 1% de SITE-3 (figure 3.2) est en accord avec la diminution du nombre de cellules présentes (figure 3.1B). De même, les faibles sécrétions de hCG (figure 3.2) lorsque les trophoblastes sont en contact avec 10% de SITE-3 soutiennent la faible viabilité cellulaire visible en

immunofluorescence au quatrième jour de culture (figure 3.1C). Lorsque les trophoblastes étaient mis en contact avec un milieu contenant 0,5% de sérum de veau fœtal pour le premier jour de culture et que celui-ci était par la suite remplacé par un milieu contenant 1% de SITE-3, les cellules ne montraient pas une survie cellulaire suffisante pour que cette condition puisse être utilisée (figure 3.1E). Bien que la survie des trophoblastes soit meilleure avec cette condition de culture par rapport à celle associée aux deux conditions précédentes, les cellules ne montraient pas un tapis uniforme en immunofluorescence, signifiant qu'il y avait eu mort cellulaire (figure 3.1E). La culture des trophoblastes avec un milieu contenant 0,5% de sérum de veau fœtal et 1% de SITE-3 montre une très bonne viabilité cellulaire. Toutefois, ce milieu de culture permet la différenciation des trophoblastes, soit la formation de syncytiums (figure 3.1F) et la sécrétion de l'hormone hCG (figure 3.2). Les sécrétions de hCG au troisième et quatrième jour sont d'ailleurs supérieures à celle des trophoblastes cultivés avec 10% de sérum de veau fœtal. Comme la différenciation des trophoblastes n'est pas souhaitée, cette condition de culture fut aussi rejetée.

Notre choix s'est donc arrêté sur un milieu avec 10% de sérum de veau fœtal pour le premier jour de culture *in vitro*, qui est ensuite remplacé par un milieu de culture contenant 1% de SITE-3 pour les trois jours suivants. Il a été possible de confirmer que ce nouveau milieu de culture ne permettait pas la différenciation des cellules trophoblastiques humaines, tant au niveau morphologique (formation de syncytiums) (figure 3.1D) qu'au niveau biochimique (sécrétion de hCG) puisque la sécrétion de hCG est inférieure à celle obtenue avec le milieu de référence (figure 3.2). Kao et al. (1988) avaient cependant démontré que l'omission de sérum dans le milieu de culture des cellules trophoblastiques empêchait la formation de syncytiums, mais permettait la sécrétion de hCG. Cette étude a toutefois été faite après 24 heures de culture et ne contenait pas d'informations sur la viabilité cellulaire. Nous croyons donc que notre milieu additionné de SITE-3 est plus adéquat pour une culture *in vitro* de quatre jours puisque nous avons démontré la viabilité. Ainsi, la mise au point d'un tel milieu de culture permet une nouvelle approche pour l'étude de la différenciation des trophoblastes humains.

4.2 Viabilité cellulaire

Avant de débiter les expérimentations, il a tout d'abord fallu s'assurer que les traitements à l'étude n'affectaient pas la viabilité cellulaire. Ainsi, l'omission de sérum de veau fœtal au milieu de culture des cellules trophoblastiques et l'ajout de différentes concentrations de PTHrP (1-34) n'affectent pas la viabilité cellulaire (figure 3.3). Les résultats obtenus par la suite sont donc bel et bien dus directement aux traitements étudiés et non causés par une certaine toxicité ou une réaction de stress dues à ces mêmes traitements. Aussi, ces résultats confirment que le milieu de remplacement utilisé dans cette étude est un choix approprié.

4.3 Effet de la PTHrP (1-34) sur la différenciation des trophoblastes humains

L'effet de la PTHrP sur la différenciation des cellules trophoblastiques géantes a déjà été déterminé chez la souris (El-Hashash et al., 2005). Chez l'humain, ces cellules correspondent aux trophoblastes invasifs extra-villeux (Cross, 2000). Le cône ectoplacentaire contient des cellules qui vont devenir des cellules géantes secondaires ou des spongiotrophoblastes (Carney et al., 1993). Ainsi, la PTHrP (1-34) régule la différenciation des TGC en agissant sur les précurseurs et sur la différenciation terminale, en plus de permettre l'expression de marqueurs caractéristiques des TGC. Compte tenu de la similitude entre les cellules trophoblastiques humaines et de souris, nous avons voulu vérifier si la PTHrP (1-34) pouvait aussi agir sur la différenciation des cellules trophoblastiques humaines.

La morphologie cellulaire (figure 3.4) ainsi que la sécrétion de hCG (figure 3.5) montrent bien que le milieu sans sérum, mais avec SITE-3 ne permet pas la différenciation cellulaire puisqu'il ne contient pas les hormones et facteurs de croissance nécessaires. En effet, après quatre jours de culture, on retrouve un tapis unicellulaire et une sécrétion hormonale de hCG significativement inférieure à celle occasionnée par le milieu contenant 10% de sérum de veau fœtal. L'ajout de concentrations de 10^{-8} et 10^{-6} M du fragment N-terminal de la PTHrP permet la différenciation morphologique des cellules trophoblastiques de manière similaire à celle occasionnée par le milieu avec sérum de veau fœtal (figure 3.4). De plus, l'ajout de

10^{-6} M de PTHrP semble augmenter la sécrétion de hCG au troisième et quatrième jour de culture par rapport au milieu contrôle. Ainsi, de fortes concentrations de PTHrP (1-34) causent la différenciation des cellules trophoblastiques humaines, tant au niveau morphologique que biochimique. Cette différenciation n'est causée que par l'hormone puisque le milieu ne contient aucune autre hormone ou facteur de croissance. Toutefois, les concentrations permettant la différenciation cellulaire sont bien au-delà de celles retrouvées physiologiquement. Ainsi, on retrouve des concentrations de 2,7 pmol/L de PTHrP (1-34) dans le plasma maternel, de 41,8 pmol/L dans le liquide amniotique, et de 6,6 et 3,2 dans l'artère et les veines du cordon ombilical (Farrugia et al., 2000b). Cela laisse donc supposer que la PTHrP (1-34) ne peut agir seule pour induire la différenciation cellulaire et que d'autres hormones ou facteurs de croissance sont nécessaires à la différenciation des trophoblastes humains *in vivo*. Ainsi, il faudrait vérifier si l'ajout à la PTHrP (1-34) de d'autres facteurs connus causant la différenciation en ST serait nécessaire pour induire ce phénomène à des concentrations physiologiques. Afin de mieux comprendre les mécanismes régissant ce phénomène, il faudrait aussi étudier si d'autres facteurs de croissance causeraient la différenciation des trophoblastes humains en ST.

Compte tenu que les MAPKs ERK1/2 et p38 sont impliquées dans le processus d'initiation de la différenciation, nous voulions savoir si la PTHrP (1-34) ne permettait pas l'activation d'au moins une de ces kinases lors de la différenciation en ST. Les différentes conditions étudiées ne modifient pas l'activation de la MAPK p38 et ce, aux quatre jours de culture *in vitro* (figure 3.6). Daoud et al. (2005) avaient cependant démontré que cette kinase était davantage activée lors des 24 premières heures de culture et qu'elle était impliquée dans l'initiation du processus de différenciation. Ces données ajoutées aux résultats obtenus suggèrent que l'activation de p38 au premier jour de culture ne dépend pas de la PTHrP (1-34), mais d'un autre facteur de croissance contenu dans le sérum de veau fœtal. Lorsqu'il y a liaison d'un ligand à son RCPG, la MAPK p38 ne peut être activée que par le relâchement de la protéine $G_{\alpha o}$. Cependant, la PTHrP ne peut stimuler que le relâchement des protéines $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha q}$ du récepteur PTH1R, mais pas celui de $G_{\alpha o}$. Ainsi, tout comme les résultats obtenus le suggèrent, la PTHrP (1-34) ne peut agir directement par cette voie de

signalisation pour induire la différenciation cellulaire puisqu'elle est incapable d'activer cette kinase.

Inversement, l'activation de la MAPK ERK1/2 semble être modulée par la PTHrP (1-34). L'ajout de concentrations supra-physiologiques de l'hormone permet d'augmenter l'activation de la kinase. Plus précisément, une concentration de 10^{-6} M de PTHrP (1-34) augmente significativement l'activation de ERK1/2 au premier jour de culture, alors qu'une concentration de 10^{-8} M augmente significativement l'activation de cette kinase au quatrième jour de culture (figure 3.7). Ainsi, le fragment N-terminal de la PTHrP pourrait être impliqué dans l'activation de ERK1/2 tout au long du processus de différenciation des cellules trophoblastiques humaines. Plus précisément, lorsque lié à son récepteur, la PTHrP (1-34) va permettre le relâchement des protéines $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha q}$, ce qui va entraîner l'activation de leur effecteur, soit l'adénylate cyclase et la phospholipase C. Ceux-ci vont activer PKA et PKC, ce qui va permettre l'activation de Raf et, par la suite, celle de la voie de ERK1/2. Nous croyons donc que c'est par cette voie que le fragment N-terminal de la PTHrP peut agir sur la MAPK ERK1/2 afin de stimuler la différenciation des cellules trophoblastiques humaines. Il faudrait toutefois effectuer d'autres analyses afin de confirmer cette hypothèse.

Comme Daoud et al. (2005) avaient démontré l'implication de cette kinase lors de l'initiation du processus de différenciation, nous avons jugé opportun de répéter l'expérience qu'ils avaient effectuée à l'aide de l'inhibiteur de MEK1/2, PD98059. Cet inhibiteur agit sur la kinase en amont de ERK1/2 et, ainsi, empêche l'activation de cette dernière. Alors que l'inhibiteur PD98059 neutralise cette voie de signalisation, l'ajout d'un milieu avec sérum de veau fœtal lève l'inhibition de MEK1/2 et permet la phosphorylation de ERK (figure 3.8). L'ajout de milieu sans sérum mais additionné du supplément SITE-3 ou d'un milieu avec PTHrP (1-34) est capable de réactiver cette voie, bien que cela soit de manière moins importante qu'avec le sérum de veau fœtal. Toutefois, comme il y a réactivation de la voie en présence tout comme en absence de PTHrP (1-34), on ne peut dire si cette hormone est impliquée dans la réactivation de ERK1/2 au premier jour de culture. Il serait intéressant d'effectuer à nouveau cette expérience afin de déterminer à quel moment ERK1/2 est impliqué dans le processus de différenciation des cellules trophoblastiques humaines.

4.4 Effet de la PTHrP (1-34) sur le transport de calcium

Globalement, le fragment 1-34 de la PTHrP n'agit pas de manière significative sur le transport calcique des cellules trophoblastiques humaines. Ainsi, tout comme Care et al. (1990) l'avait démontré chez la brebis et Kovacs et Kronenberg (1997), à leur tour, chez la souris, la PTHrP (1-34) n'est pas impliquée dans le transport de cet ion à travers le placenta. Cependant, l'ajout de cette hormone à des concentrations de 10^{-8} et 10^{-6} M à un milieu de culture sans FBS permet l'augmentation significative de l'expression protéique des pompes membranaires PMCA1 et 4 au premier jour de culture (figure 3.18). Comme il s'agit de concentrations supra-physiologiques, on ne peut toutefois pas affirmer que le fragment N-terminal de la PTHrP a le même effet *in vivo*. Compte tenu de l'effet observé ici, il serait cependant intéressant d'approfondir les connaissances acquises afin de mieux comprendre l'effet de la PTHrP (1-34) sur les pompes PMCA1 et 4. Considérant la capacité de la PTHrP à activer PKC (Laramée et al., 2002) et de la propriété de PKC à moduler l'activité des PMCA (Smallwood et al., 1988), il se pourrait que la PTHrP (1-34) agisse sur ces pompes par cette voie. Plus précisément, Enyedi et al. (1996) ont démontré que la stimulation de PKC permet d'augmenter l'activation de PMCA4b. Pour cela, il faudrait mesurer la libération de phosphate inorganique suite à l'incubation des pompes avec de l'ATP. Ainsi, la purification des membranes placentaires BBM et BPM telle que décrite par Lafond et al. (1988) pourrait être utilisée pour l'étude de l'activité des différents transporteurs du calcium (Lafond et al., 1988). En effet, l'isolation de la BPM pourrait précéder l'étude de l'activité des pompes PMCA telle que décrite par Smallwood et al. (1988). Brièvement, suite à l'isolation des pompes PMCA de la BPM, il y aurait ajout de [32 P]ATP afin de mesurer l'utilisation de l'ATP par la pompe membranaire. Ces deux techniques seraient plus adéquates pour déterminer l'effet du fragment N-terminal sur l'activité de ces pompes. Il s'agirait d'une voie intéressante à emprunter pour compléter cette étude. De plus, il serait important de regarder l'effet de la PTHrP (1-34) sur la CaM, puisque cette dernière régule l'activité de ces pompes. Strid et al. (2002) avaient déjà souligné la nécessité d'une concentration supra-physiologique de PTHrP (1-34) pour permettre une augmentation du transport de calcium dépendant de l'ATP. Cette étude avait toutefois été effectuée pour les membranes basales des ST. L'étude présentée ici souligne donc ces résultats avec une nouvelle approche.

Bien qu'aucun autre résultat ne démontre un effet significatif de la PTHrP (1-34) sur la captation du calcium et sur l'expression des protéines impliquées dans le transport du calcium, cela ne signifie pas pour autant que cette hormone ne joue pas un rôle dans le transport de l'ion calcique à travers le placenta. En effet, la PTHrP (1-34) pourrait influencer l'activité des différentes protéines étudiées de manière indirecte. Par exemple, compte tenu que le calcium intracellulaire exerce un mécanisme de rétro-contrôle négatif sur l'activité de TRPV5 et 6 (den Dekker et al., 2003), il serait intéressant de mesurer la concentration intracellulaire de calcium suite aux différents traitements. Cela pourrait se faire, par exemple, par fluorométrie suite à une incubation avec du Fura-2-acetoxymethyl ester (Molecular Probe) (Li et al., 2008). De plus, en permettant la formation osseuse (Miao et al., 2004), la PTHrP agit sur l'homéostasie du calcium, ce qui entraîne une diminution de la calcémie. Cette diminution de la concentration intracellulaire de calcium induite par la PTHrP pourrait donc activer les canaux TRPV5 et 6. Ainsi, la PTHrP pourrait réguler de manière indirecte l'expression des canaux TRPV5 et 6 de par son effet sur l'homéostasie du calcium.

Cette étude a aussi permis d'approfondir les connaissances existantes sur l'effet de la PTHrP puisqu'aucune donnée n'était disponible quant à l'effet du fragment N-terminal de la PTHrP sur l'expression des canaux TRPV5 et 6. De plus, ce travail de recherche rapporte pour la première fois les effets de la PTHrP sur l'expression de TCTP, tant au niveau génique que protéique. En fait, ce travail est le premier à rapporter l'expression de cette protéine dans les cellules trophoblastiques en culture issues de placentas humains. On sait depuis peu que TCTP peut lier le calcium et que cette protéine pourrait donc agir pour transporter le calcium à l'intérieur du ST. Arcuri et al. (2005) avaient déjà démontré la présence de TCTP dans les cellules de lignée HTR-8/SVneo et le tissu placentaire, plus précisément à l'intérieur des CT villosus et des ST, mais aucune étude n'avait été faite chez des cellules placentaires en culture.

Compte tenu qu'aucune étude ne rapporte l'expression de TCTP chez les cellules trophoblastiques humaines en culture, nous sommes les premiers à rapporter l'expression de cette protéine au premier et au quatrième jour de culture. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution significative de l'expression génique de TCTP chez les ST par rapport aux trophoblastes lorsqu'il y a présence de FBS (jour 1 de culture) (figure 3.12). Comme il s'agit

d'une protéine impliquée dans le transport de l'ion calcique et que le transfert du calcium est augmenté dans les ST, nous nous attendions à obtenir une expression plus importante au quatrième jour de culture. Toutefois, TCTP est reconnue pour être une protéine dont l'expression est modulée selon le type cellulaire (Thiele et al., 2000) et le stade de développement au cours de la vie (Rao et al., 2002). Cependant, au niveau protéinique, il n'y a pas de différence d'expression de TCTP au cours de la différenciation cellulaire (figure 3.17). Ainsi, malgré une transcription de son ARNm plus importante au premier jour de culture, il y aurait un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle ou de dégradation post-traductionnelle qui permettrait une régulation de TCTP afin de maintenir un niveau constant de cette protéine au cours des quatre jours de culture. En effet, TCTP est une protéine dont l'expression est hautement régulée, tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel par une variété de stimuli extra-cellulaires (Thiele et al., 2000). De plus, Xu et al. (1999) ont pu démontrer que le niveau de calcium peut réguler l'expression de cette protéine. En fait, une diminution du calcium retrouvé dans le réticulum endoplasmique cause une augmentation de l'expression de l'ARNm de TCTP, alors qu'une augmentation du calcium cytoplasmique agit sur l'expression post-transcriptionnelle de la protéine. Ainsi, il faudrait mesurer le calcium intracellulaire par fluorométrie au cours de la différenciation afin de vérifier si des variations de cet ion ne seraient pas à l'origine de cette diminution de l'expression génique de TCTP au quatrième jour de culture.

Il est aussi possible de noter une expression génique plus importante de PMCA1 que de PMCA4. Bien qu'une telle comparaison de l'expression de ces deux pompes n'ait jamais été faite pour le placenta, ces résultats sont similaires à ceux de Stauffer et al. (1995) qui avaient regardé l'expression de ces deux pompes dans plusieurs organes et types cellulaires. Ainsi, tout comme pour les reins et les cellules HeLa (Stauffer et al., 1995), on retrouve une expression plus importante de PMCA1 par rapport à PMCA4 dans les cellules trophoblastiques humaines.

Comme tout modèle, le modèle utilisé pour réaliser cette étude comporte des avantages et des inconvénients. Les cellules trophoblastiques issues de placentas humains sont plus représentatives de la réalité *in vivo* que l'utilisation de lignées cellulaires. En effet, les

trophoblastes isolés vont fusionner spontanément pour former des ST grâce à la présence de facteurs de croissance et d'hormones dans le milieu de culture, alors que les lignées cellulaires trophoblastiques telles JEG-3, Bewo et JAR nécessitent l'ajout de la forskoline pour fusionner. De plus, comme les lignées cellulaires sont des cellules immortalisées, leur génome est altéré ainsi que leur morphologie et l'expression de certaines protéines. Le modèle choisi dans cette étude engendre cependant de grandes variations dans les résultats obtenus compte tenu des différences inter-individuelles, ce qui explique les grandes variations retrouvées dans certains résultats (figure 3.5 par exemple). Avec de telles variations, il est donc plus ardu de conclure à un effet significatif de la PTHrP (1-34) sur la différenciation et le transport calcique des trophoblastes humains.

CHAPITRE V

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1 Conclusions

Suite à ce travail de recherche, nous avons tout d'abord pu élaborer un nouveau milieu de culture pour les cellules trophoblastiques en culture isolées à partir de placentas humains. Ce milieu sans sérum, mais additionné du supplément SITE-3 ne permet pas la différenciation des trophoblastes en ST tout en ne causant pas de toxicité cellulaire. Ainsi, il est possible d'étudier l'effet de divers facteurs de croissance et d'hormones sur la différenciation cellulaire des trophoblastes sans l'interférence des composantes présentes dans le supplément habituel, soit le sérum bovin foetal. Un tel milieu pourra donc être utilisé à l'avenir pour étudier l'effet de différentes hormones et facteurs de croissance sur la différenciation des cellules trophoblastiques humaines.

Tout comme chez la souris, la PTHrP (1-34) est capable d'induire la différenciation cellulaire des cellules trophoblastiques humaines. Nous avons pu observer une augmentation de la fusion cellulaire lorsque de fortes concentrations du fragment N-terminal de la PTHrP étaient ajoutées au milieu de culture. De plus, ces concentrations supra-physiologiques étaient capables d'augmenter l'activation de la MAPK ERK1/2, ce qui laisse croire que le processus de différenciation pourrait être dépendant de cette kinase. Toutefois, comme des concentrations supra-physiologiques étaient nécessaires afin d'observer un tel phénomène, nous ne pouvons extrapoler ces résultats au phénomène de fusion cellulaire qui survient *in vivo*.

Par la suite, nous avons vérifié si le fragment N-terminal de la PTHrP pouvait augmenter le transport du calcium à travers les ST et augmenter l'expression des protéines impliquées dans ce transport. Les résultats obtenus montrent que de fortes concentrations du fragment

N-terminal de la PTHrP permettent une augmentation de l'expression des protéines PMCA1 et 4 au premier jour de culture. Aucun autre effet significatif ne fut observé sur le transport de l'ion calcique ou l'expression des autres protéines impliquées dans le transport du calcium.

Bien que nos hypothèses ne furent confirmées qu'en partie, ce travail visait avant tout à explorer l'effet du fragment 1-34 de la PTHrP chez les cellules trophoblastiques humaines que de découvrir une voie spécifique d'action de cette hormone. Ainsi, bien que peu de résultats apportent des réponses concluantes, nous avons pu démontrer, et ce pour la première fois, l'effet de la PTHrP (1-34) sur l'expression des canaux TRPV5 et 6, de la protéine liant le calcium TCTP et des pompes membranaires PMCA1, 2 et 4 chez les cellules trophoblastiques humaines au cours de la différenciation cellulaire. De plus, nous avons pu confirmer pour la première fois l'expression de TCTP chez les trophoblastes humains en culture, tant au niveau génique que protéique.

5.2 Perspectives

Comme des concentrations supra-physiologiques de PTHrP (1-34) sont nécessaires *in vitro* afin de causer la différenciation des cellules trophoblastiques humaines, il faudrait étudier si la combinaison de facteurs connus causant un tel phénomène est capable d'induire la différenciation cellulaire à des concentrations physiologiques. De plus, la recherche d'autres facteurs pouvant causer la différenciation en ST est nécessaire afin d'élucider les mécanismes régissant ce processus cellulaire. Afin de mieux comprendre ce phénomène, il faudrait aussi regarder les effets du fragment N-terminal de la PTHrP sur l'activation d'autres kinases. Il serait aussi intéressant d'approfondir l'implication de la PTHrP (1-34) dans l'étiologie du RCIU.

Comme nous soupçonnons que la PTHrP (1-34) affecte les niveaux d'activité des protéines impliquées dans le transport de l'ion calcique, il serait judicieux d'explorer cette hypothèse. Ainsi, nous pourrions vérifier si le fragment N-terminal de la PTHrP agit par la CaM ou la PKC afin de moduler le niveau d'activité des pompes membranaires PMCA. Il serait aussi

important de mesurer le niveau de calcium à l'intérieur des cellules trophoblastiques au cours de la différenciation puisque cet ion peut agir sur l'expression de TCTP et des canaux TRPV5 et 6. De plus, il faudrait élucider s'il existe un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle pour l'expression protéique de TCTP et de PMCA1 et 4 puisque nous en supposons la présence. Comme l'effet de la PTHrP (38-94) a déjà été démontré sur le transport du calcium dépendant de l'ATP (Strid et al., 2002), il faudrait approfondir ces résultats en étudiant l'effet de ce fragment de la PTHrP sur l'expression et les niveaux d'activités des différentes protéines impliquées dans le transport de l'ion calcique à travers le placenta. De plus, il serait judicieux d'observer l'effet de la PTHrP (1-34) sur les protéines impliquées dans le transport du calcium lorsqu'elle est mise en contact avec des cellules trophoblastiques provenant de femmes avec PE.

En espérant que les résultats de ce travail pourront servir de point de départ à l'étude approfondie d'un aspect de la PTHrP (1-34) sur la différenciation ou le transport calcique des trophoblastes humains.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBAS, S. K., PICKARD, D. W., ILLINGWORTH, D., STORER, J., PURDIE, D. W., MONIZ, C., DIXIT, M., CAPLE, I. W., EBELING, P. R., RODDA, C. P. & ET AL. (1990) Measurement of parathyroid hormone-related protein in extracts of fetal parathyroid glands and placental membranes. *J Endocrinol*, 124, 319-25.
- AHN, N. G., SEGER, R., BRATLIEN, R. L., DILTZ, C. D., TONKS, N. K. & KREBS, E. G. (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem*, 266, 4220-7.
- ALBRECHT, E. D. & PEPE, G. J. (1990) Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev*, 11, 124-50.
- ALSAT, E., HAZIZA, J. & EVAÏN-BRION, D. (1993) Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol*, 154, 122-8.
- ALSAT, E., WYPLOSZ, P., MALASSINE, A., GUIBOURDENCHE, J., PORQUET, D., NESSMANN, C. & EVAÏN-BRION, D. (1996) Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol*, 168, 346-53.
- ALSAT, E., GUIBOURDENCHE, J., LUTON, D., FRANKENNE, F. & EVAÏN-BRION, D. (1997) Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol*, 177, 1526-34.
- ANDERSON, N. G., MALLER, J. L., TONKS, N. K. & STURGILL, T. W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, 343, 651-3.
- APLIN, J. D. (1991) Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci*, 99 (Pt 4), 681-92.
- APLIN, J. D. & KIMBER, S. J. (2004) Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol*, 2, 48.
- ARCURI, F., PAPA, S., CARDUCCI, A., ROMAGNOLI, R., LIBERATORI, S., RIPARBELLI, M. G., SANCHEZ, J. C., TOSI, P. & DEL VECCHIO, M. T. (2004) Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate*, 60, 130-40.
- ARCURI, F., PAPA, S., MEINI, A., CARDUCCI, A., ROMAGNOLI, R., BIANCHI, L., RIPARBELLI, M. G., SANCHEZ, J. C., PALMI, M., TOSI, P. & CINTORINO, M. (2005) The translationally controlled tumor protein is a novel calcium binding protein of the human placenta and regulates calcium handling in trophoblast cells. *Biol Reprod*, 73, 745-51.
- AZARANI, A., ORLOWSKI, J. & GOLTZMAN, D. (1995) Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide activate the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform in osteoblastic cells (UMR-106) via a cAMP-dependent pathway. *J Biol Chem*, 270, 23166-72.
- BARKER, D. J., GLUCKMAN, P. D., GODFREY, K. M., HARDING, J. E., OWENS, J. A. & ROBINSON, J. S. (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341, 938-41.

- BARLET, J. P. & RAVAUULT, J. P. (1984) Calcitonin treatment and plasma prolactin levels in pregnant and lactating ewes. *Reprod Nutr Dev*, 24, 63-9.
- BELKACEMI, L., GARIEPY, G., MOUNIER, C., SIMONEAU, L. & LAFOND, J. (2003) Expression of calbindin-D28k (CaBP28k) in trophoblasts from human term placenta. *Biol Reprod*, 68, 1943-50.
- BELKACEMI, L., GARIEPY, G., MOUNIER, C., SIMONEAU, L. & LAFOND, J. (2004) Calbindin-D9k (CaBP9k) localization and levels of expression in trophoblast cells from human term placenta. *Cell Tissue Res*, 315, 107-17.
- BELL, N. H. (1985) Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest*, 76, 1-6.
- BERGGARD, T., THULIN, E., AKERFELDT, K. S. & LINSE, S. (2000) Fragment complementation of calbindin D28k. *Protein Sci*, 9, 2094-108.
- BIDART, J. M., LACROIX, L., EVAÏN-BRION, D., CAILLOU, B., LAZAR, V., FRYDMAN, R., BELLET, D., FILETTI, S. & SCHLUMBERGER, M. (2000) Expression of Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4367-72.
- BLAUSTEIN, M. P. & LEDERER, W. J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev*, 79, 763-854.
- BLOND, J. L., LAVILLETTE, D., CHEYNET, V., BOUTON, O., ORIOL, G., CHAPEL-FERNANDES, S., MANDRAND, B., MALLET, F. & COSSET, F. L. (2000) An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74, 3321-9.
- BOHM, H., BENNDORF, R., GAESTEL, M., GROSS, B., NURNBERG, P., KRAFT, R., OTTO, A. & BIELKA, H. (1989) The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem Int*, 19, 277-86.
- BOMMER, U. A. & THIELE, B. J. (2004) The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 379-85.
- BOULTON, T. G., YANCOPOULOS, G. D., GREGORY, J. S., SLAUGHTER, C., MOOMAW, C., HSU, J. & COBB, M. H. (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, 249, 64-7.
- BOULTON, T. G. & COBB, M. H. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regul*, 2, 357-71.
- BOULTON, T. G., NYE, S. H., ROBBINS, D. J., IP, N. Y., RADZIEJEWSKA, E., MORGENBESSER, S. D., DEPINHO, R. A., PANAYOTATOS, N., COBB, M. H. & YANCOPOULOS, G. D. (1991) ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, 65, 663-75.
- BOWDEN, S. J., EMLY, J. F., HUGHES, S. V., POWELL, G., AHMED, A., WHITTLE, M. J., RATCLIFFE, J. G. & RATCLIFFE, W. A. (1994) Parathyroid hormone-related protein in human term placenta and membranes. *J Endocrinol*, 142, 217-24.
- BOYD, J. D. & HAMILTON, W. J. (1966) Electron microscopic observations on the cytotrophoblast contribution to the syncytium in the human placenta. *J Anat*, 100, 535-48.
- BRUN, P., DUPRET, J. M., PERRET, C., THOMASSET, M. & MATHIEU, H. (1987) Vitamin D-dependent calcium-binding proteins (CaBPs) in human fetuses:

- comparative distribution of 9K CaBP mRNA and 28K CaBP during development. *Pediatr Res*, 21, 362-7.
- BUDAYR, A. A., HALLORAN, B. P., KING, J. C., DIEP, D., NISSENSON, R. A. & STREWLER, G. J. (1989) High levels of a parathyroid hormone-like protein in milk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7183-5.
- CARE, A. D., ABBAS, S. K., PICKARD, D. W., BARRI, M., DRINKHILL, M., FINDLAY, J. B., WHITE, I. R. & CAPLE, I. W. (1990) Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid hormone-related protein. *Exp Physiol*, 75, 605-8.
- CARNEY, E. W., PRIDEAUX, V., LYE, S. J. & ROSSANT, J. (1993) Progressive expression of trophoblast-specific genes during formation of mouse trophoblast giant cells in vitro. *Mol Reprod Dev*, 34, 357-68.
- CHAUDHARY, A., KING, W. G., MATTALIANO, M. D., FROST, J. A., DIAZ, B., MORRISON, D. K., COBB, M. H., MARSHALL, M. S. & BRUGGE, J. S. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol*, 10, 551-4.
- CHRISTAKOS, S., GABRIELIDES, C. & RHOTEN, W. B. (1989) Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev*, 10, 3-26.
- CIVITELLI, R., MARTIN, T. J., FAUSTO, A., GUNSTEN, S. L., HRUSKA, K. A. & AVIOLI, L. V. (1989) Parathyroid hormone-related peptide transiently increases cytosolic calcium in osteoblast-like cells: comparison with parathyroid hormone. *Endocrinology*, 125, 1204-10.
- CLAPHAM, D. E., RUNNELS, L. W. & STRUBING, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2, 387-96.
- CLEMENS, T. L., CORMIER, S., EICHINGER, A., ENDLICH, K., FIASCHI-TAESCH, N., FISCHER, E., FRIEDMAN, P. A., KARAPLIS, A. C., MASSFELDER, T., ROSSERT, J., SCHLUTER, K. D., SILVE, C., STEWART, A. F., TAKANE, K. & HELWIG, J. J. (2001) Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol*, 134, 1113-36.
- CORNISH, J., CALLON, K. E., NICHOLSON, G. C. & REID, I. R. (1997) Parathyroid hormone-related protein-(107-139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology*, 138, 1299-304.
- CORNISH, J., CALLON, K. E., LIN, C., XIAO, C., MOSELEY, J. M. & REID, I. R. (1999) Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res*, 14, 915-22.
- CREWS, C. M., ALESSANDRINI, A. & ERIKSON, R. L. (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*, 258, 478-80.
- CROCKER, I., KAUR, M., HOSKING, D. J. & BAKER, P. N. (2002) Rescue of trophoblast apoptosis by parathyroid hormone-related protein. *Bjog*, 109, 218-20.
- CRONIER, L., BASTIDE, B., HERVE, J. C., DELEZE, J. & MALASSINE, A. (1994) Gap junctional communication during human trophoblast differentiation: influence of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 135, 402-8.

- CRONIER, L., HERVE, J. C., DELEZE, J. & MALASSINE, A. (1997) Regulation of gap junctional communication during human trophoblast differentiation. *Microsc Res Tech*, 38, 21-8.
- CROSS, J. C., WERB, Z. & FISHER, S. J. (1994) Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, 266, 1508-18.
- CROSS, J. C. (2000) Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 11, 105-13.
- CUENDA, A. & COHEN, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem*, 274, 4341-6.
- CURTIS, N. E., KING, R. G., MOSELEY, J. M., HO, P. W., RICE, G. E. & WLODEK, M. E. (2000) Preterm fetal growth restriction is associated with increased parathyroid hormone-related protein expression in the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 183, 700-5.
- DAOUD, G., AMYOT, M., RASSART, E., MASSE, A., SIMONEAU, L. & LAFOND, J. (2005) ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol*, 566, 409-23.
- DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M., BATTAGLIA, F. C., BRUNS, P. D. & MESCHIA, G. (1967) Total, protein-bound, and ultrafilterable calcium in maternal and fetal plasmas. *Am J Physiol*, 213, 363-6.
- DELORME, A. C., DANAN, J. L. & MATHIEU, H. (1983) Biochemical evidence for the presence of two vitamin D-dependent calcium-binding proteins in mouse kidney. *J Biol Chem*, 258, 1878-84.
- DEN DEKKER, E., HOENDEROP, J. G., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, 33, 497-507.
- DENT, P., REARDON, D. B., MORRISON, D. K. & STURGILL, T. W. (1995) Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro. *Mol Cell Biol*, 15, 4125-35.
- DERIJARD, B., HIBI, M., WU, I. H., BARRETT, T., SU, B., DENG, T., KARIN, M. & DAVIS, R. J. (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell*, 76, 1025-37.
- DERIJARD, B., RAINGEAUD, J., BARRETT, T., WU, I. H., HAN, J., ULEVITCH, R. J. & DAVIS, R. J. (1995) Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, 267, 682-5.
- DIAZ, B., BARNARD, D., FILSON, A., MACDONALD, S., KING, A. & MARSHALL, M. (1997) Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol*, 17, 4509-16.
- DI LEVA, F., DOMI, T., FEDRIZZI, L., LIM, D. & CARAFOLI, E. (2008) The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476 (1), pp. 65-74.
- EL-HASHASH, A. H. & KIMBER, S. J. (2004) Trophoblast differentiation in vitro: establishment and characterisation of a serum-free culture model for murine secondary trophoblast giant cells. *Reproduction*, 128, 53-71.
- EL-HASHASH, A. H., ESBRI, P. & KIMBER, S. J. (2005) PTHrP promotes murine secondary trophoblast giant cell differentiation through induction of endocycle,

- upregulation of giant-cell-promoting transcription factors and suppression of other trophoblast cell types. *Differentiation*, 73, 154-74.
- EMLY, J. F., RATCLIFFE, W. A., GREEN, E., BOWDEN, S. J., HEATH, D. A., BLIGHT, A., HUGHES, S. & RATCLIFFE, J. G. (1992) Immunochemical characterisation of parathyroid hormone-related protein from tumour and non-tumour cells. *Biochim Biophys Acta*, 1180, 58-64.
- ENGELMAN, J. A., LISANTI, M. P. & SCHERER, P. E. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, 273, 32111-20.
- ENGELMAN, J. A., BERG, A. H., LEWIS, R. Y., LIN, A., LISANTI, M. P. & SCHERER, P. E. (1999) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*, 274, 35630-8.
- ENSLIN, H., BRANCHO, D. M. & DAVIS, R. J. (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo J*, 19, 1301-11.
- ENYEDI, A., FLURA, M., SARKADI, B., GARDOS, G. & CARAFOLI, E. (1987) The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J Biol Chem*, 262, 6425-30.
- ENYEDI, A., VERMA, A. K., FILOTEO, A. G. & PENNISTON, J. T. (1996) Protein kinase C activates the plasma membrane Ca²⁺ pump isoform 4b by phosphorylation of an inhibitory region downstream of the calmodulin-binding domain. *J Biol Chem*, 271, 32461-7.
- ESKENAZI, B., FENSTER, L., SIDNEY, S. & ELKIN, E. P. (1993) Fetal growth retardation in infants of multiparous and nulliparous women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 169, 1112-8.
- FABIAN, J. R., DAAR, I. O. & MORRISON, D. K. (1993) Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol*, 13, 7170-9.
- FARRUGIA, W., DE GOOYER, T., RICE, G. E., MOSELEY, J. M. & WLODEK, M. E. (2000a) Parathyroid hormone(1-34) and parathyroid hormone-related protein(1-34) stimulate calcium release from human syncytiotrophoblast basal membranes via a common receptor. *J Endocrinol*, 166, 689-95.
- FARRUGIA, W., HO, P. W., RICE, G. E., MOSELEY, J. M., PERMEZEL, M. & WLODEK, M. E. (2000b) Parathyroid hormone-related protein(1-34) in gestational fluids and release from human gestational tissues. *J Endocrinol*, 165, 657-62.
- FENTON, A. J., KEMP, B. E., KENT, G. N., MOSELEY, J. M., ZHENG, M. H., ROWE, D. J., BRITTO, J. M., MARTIN, T. J. & NICHOLSON, G. C. (1991) A carboxyl-terminal peptide from the parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology*, 129, 1762-8.
- FERGUSON, J. E., 2ND, GORMAN, J. V., BRUNS, D. E., WEIR, E. C., BURTIS, W. J., MARTIN, T. J. & BRUNS, M. E. (1992) Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in human amnion and its association with labor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 8384-8.
- FERGUSON, J. E., 2ND, SEANER, R., BRUNS, D. E., REDICK, J. A., MILLS, S. E., JUPPNER, H., SEGRE, G. V. & BRUNS, M. E. (1994) Expression of parathyroid hormone-related protein and its receptor in human umbilical cord: evidence for a paracrine system involving umbilical vessels. *Am J Obstet Gynecol*, 170, 1018-24; discussion 1024-6.

- FERRELL, J. E., JR. (1996) Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, 21, 460-6.
- FERRELL, J. E., JR. (1997) How responses get more switch-like as you move down a protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci*, 22, 288-9.
- FERRELL, J. E., JR. (1999) Building a cellular switch: more lessons from a good egg. *Bioessays*, 21, 866-70.
- FLEET, J. C., EKSIR, F., HANCE, K. W. & WOOD, R. J. (2002) Vitamin D-inducible calcium transport and gene expression in three Caco-2 cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G618-25.
- FOLEY, J., LONGELY, B. J., WYSOLMERSKI, J. J., DREYER, B. E., BROADUS, A. E. & PHILBRICK, W. M. (1998) PTHrP regulates epidermal differentiation in adult mice. *J Invest Dermatol*, 111, 1122-8.
- FOREST, J. C., MASSE, J., MOUTQUIN, J. M. & RADOUCO-THOMAS, M. (1989) [Preeclampsia: physiopathology and prospects for early detection]. *Clin Biochem*, 22, 483-9.
- FRAHER, L. J., HODSMAN, A. B., JONAS, K., SAUNDERS, D., ROSE, C. I., HENDERSON, J. E., HENDY, G. N. & GOLTZMAN, D. (1992) A comparison of the in vivo biochemical responses to exogenous parathyroid hormone-(1-34) [PTH-(1-34)] and PTH-related peptide-(1-34) in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 417-23.
- FRANKENNE, F., SCIPPO, M. L., VAN BEEUMEN, J., IGOUT, A. & HENNEN, G. (1990) Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J Clin Endocrinol Metab*, 71, 15-8.
- FUKUNAGA, R. & HUNTER, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J*, 16, 1921-33.
- GALBIATI, F., VOLONTE, D., ENGELMAN, J. A., SCHERER, P. E. & LISANTI, M. P. (1999) Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J Biol Chem*, 274, 30315-21.
- GLEESON, L. M., CHAKRABORTY, C., MCKINNON, T. & LALA, P. K. (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through alpha 5 beta 1 integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 2484-93.
- GNANASEKAR, M., RAO, K. V., CHEN, L., NARAYANAN, R. B., GEETHA, M., SCOTT, A. L., RAMASWAMY, K. & KALIRAJ, P. (2002) Molecular characterization of a calcium binding translationally controlled tumor protein homologue from the filarial parasites *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti*. *Mol Biochem Parasitol*, 121, 107-18.
- GOEDERT, M., CUENDA, A., CRAXTON, M., JAKES, R. & COHEN, P. (1997) Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J*, 16, 3563-71.
- GONZALEZ, F. A., RADEN, D. L., RIGBY, M. R. & DAVIS, R. J. (1992) Heterogeneous expression of four MAP kinase isoforms in human tissues. *FEBS Lett*, 304, 170-8.

- GOPINATH, R. M. & VINCENZI, F. F. (1977) Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{ATPase}$. *Biochem Biophys Res Commun*, 77, 1203-9.
- GOTOH, Y., NISHIDA, E., MATSUDA, S., SHIINA, N., KOSAKO, H., SHIOKAWA, K., AKIYAMA, T., OHTA, K. & SAKAI, H. (1991) In vitro effects on microtubule dynamics of purified *Xenopus* M phase-activated MAP kinase. *Nature*, 349, 251-4.
- GROSS, M. & KUMAR, R. (1990) Physiology and biochemistry of vitamin D-dependent calcium binding proteins. *Am J Physiol*, 259, F195-209.
- HALHALI, A., WIMALAWANSA, S. J., BERENTSEN, V., AVILA, E., THOTA, C. S. & LARREA, F. (2001) Calcitonin gene- and parathyroid hormone-related peptides in preeclampsia: effects of magnesium sulfate. *Obstet Gynecol*, 97, 893-7.
- HAN, J., LEE, J. D., BIBBS, L. & ULEVITCH, R. J. (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 265, 808-11.
- HAN, J., LEE, J. D., JIANG, Y., LI, Z., FENG, L. & ULEVITCH, R. J. (1996) Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J Biol Chem*, 271, 2886-91.
- HOENDEROP, J. G., HARTOG, A., STUIVER, M., DOUCET, A., WILLEMS, P. H. & BINDELS, R. J. (2000) Localization of the epithelial Ca^{2+} channel in rabbit kidney and intestine. *J Am Soc Nephrol*, 11, 1171-8.
- HOENDEROP, J. G., MULLER, D., VAN DER KEMP, A. W., HARTOG, A., SUZUKI, M., ISHIBASHI, K., IMAI, M., SWEEP, F., WILLEMS, P. H., VAN OS, C. H. & BINDELS, R. J. (2001a) Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J Am Soc Nephrol*, 12, 1342-9.
- HOENDEROP, J. G., VENNEKENS, R., MULLER, D., PRENEN, J., DROOGMANS, G., BINDELS, R. J. & NILIUS, B. (2001b) Function and expression of the epithelial Ca^{2+} channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol*, 537, 747-61.
- HOENDEROP, J. G., DARDENNE, O., VAN ABEL, M., VAN DER KEMP, A. W., VAN OS, C. H., ST-ARNAUD, R. & BINDELS, R. J. (2002a) Modulation of renal Ca^{2+} transport protein genes by dietary Ca^{2+} and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase knockout mice. *Faseb J*, 16, 1398-406.
- HOENDEROP, J. G., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2002b) Molecular mechanism of active Ca^{2+} reabsorption in the distal nephron. *Annu Rev Physiol*, 64, 529-49.
- HOENDEROP, J. G., VOETS, T., HOEFS, S., WEIDEMA, F., PRENEN, J., NILIUS, B. & BINDELS, R. J. (2003) Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J*, 22, 776-85.
- HORIUCHI, N., CAULFIELD, M. P., FISHER, J. E., GOLDMAN, M. E., MCKEE, R. L., REAGAN, J. E., LEVY, J. J., NUTT, R. F., RODAN, S. B., SCHOFIELD, T. L. & ET AL. (1987) Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro. *Science*, 238, 1566-8.
- HUANG, C. Y. & FERRELL, J. E., JR. (1996) Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 10078-83.
- HUSAIN, S. M. & MUGHAL, M. Z. (1992) Mineral transport across the placenta. *Arch Dis Child*, 67, 874-8.
- IWASAKI, S., IGUCHI, M., WATANABE, K., HOSHINO, R., TSUJIMOTO, M. & KOHNO, M. (1999) Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase

- signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem*, 274, 26503-10.
- JAMES, P., MAEDA, M., FISCHER, R., VERMA, A. K., KREBS, J., PENNISTON, J. T. & CARAFOLI, E. (1988) Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca^{2+} pump of human erythrocytes. *J Biol Chem*, 263, 2905-10.
- JARRETT, H. W. & PENNISTON, J. T. (1977) Partial purification of the Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5' - cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun*, 77, 1210-6.
- JELINEK, T., DENT, P., STURGILL, T. W. & WEBER, M. J. (1996) Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol*, 16, 1027-34.
- JIANG, Y., CHEN, C., LI, Z., GUO, W., GEGNER, J. A., LIN, S. & HAN, J. (1996) Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*, 271, 17920-6.
- JIANG, Y., GRAM, H., ZHAO, M., NEW, L., GU, J., FENG, L., DI PADOVA, F., ULEVITCH, R. J. & HAN, J. (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem*, 272, 30122-8.
- JUPPNER, H. (1999) Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide: exploration of their biological importance. *Bone*, 25, 87-90.
- KAMATH, S. G., KELLEY, L. K., FRIEDMAN, A. F. & SMITH, C. H. (1992) Transport and binding in calcium uptake by microvillous membrane of human placenta. *Am J Physiol*, 262, C789-94.
- KAMATH, S. G. & SMITH, C. H. (1994) $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange, Ca^{2+} binding, and electrogenic Ca^{2+} transport in plasma membranes of human placental syncytiotrophoblast. *Pediatr Res*, 36, 461-7.
- KAO, L. C., CALTABIANO, S., WU, S., STRAUSS, J. F., 3RD & KLIMAN, H. J. (1988) The human villous cytotrophoblast: interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation. *Dev Biol*, 130, 693-702.
- KARAPLIS, A. C., LUZ, A., GLOWACKI, J., BRONSON, R. T., TYBULEWICZ, V. L., KRONENBERG, H. M. & MULLIGAN, R. C. (1994) Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev*, 8, 277-89.
- KEMP, B. E., MOSELEY, J. M., RODDA, C. P., EBELING, P. R., WETTENHALL, R. E., STAPLETON, D., DIEFENBACH-JAGGER, H., URE, F., MICHELANGELI, V. P., SIMMONS, H. A. & ET AL. (1987) Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science*, 238, 1568-70.
- KERYER, G., ALSAT, E., TASKEN, K. & EVAIN-BRION, D. (1998) Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci*, 111 (Pt 7), 995-1004.
- KHOKHLATCHEV, A., XU, S., ENGLISH, J., WU, P., SCHAEFER, E. & COBB, M. H. (1997) Reconstitution of mitogen-activated protein kinase phosphorylation cascades in bacteria. Efficient synthesis of active protein kinases. *J Biol Chem*, 272, 11057-62.
- KHOKHLATCHEV, A. V., CANAGARAJAH, B., WILSBACHER, J., ROBINSON, M., ATKINSON, M., GOLDSMITH, E. & COBB, M. H. (1998) Phosphorylation of the

- MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93, 605-15.
- KIM, M., JUNG, Y., LEE, K. & KIM, C. (2000) Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch Pharm Res*, 23, 633-6.
- KLIMAN, H. J., NESTLER, J. E., SERMASI, E., SANGER, J. M. & STRAUSS, J. F., 3RD (1986) Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118, 1567-82.
- KOLCH, W., HEIDECKER, G., KOCHS, G., HUMMEL, R., VAHIDI, H., MISCHAK, H., FINKENZELLER, G., MARME, D. & RAPP, U. R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 364, 249-52.
- KOŁODZIEJCZYK, S. M., WANG, L., BALAZSI, K., DEREPIENTIGNY, Y., KOTHARY, R. & MEGENEY, L. A. (1999) MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol*, 9, 1203-6.
- KOSAKO, H., GOTOH, Y., MATSUDA, S., ISHIKAWA, M. & NISHIDA, E. (1992) Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *Embo J*, 11, 2903-8.
- KOSK-KOSICKA, D. & ZYLINSKA, L. (1997) Protein kinase C and calmodulin effects on the plasma membrane Ca²⁺-ATPase from excitable and nonexcitable cells. *Mol Cell Biochem*, 173, 79-87.
- KOVACS, C. S. & KRONENBERG, H. M. (1997) Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev*, 18, 832-72.
- KOVACS, C. S., CHAFE, L. L., WOODLAND, M. L., MCDONALD, K. R., FUDGE, N. J. & WOOKEY, P. J. (2002) Calcitropic gene expression suggests a role for the intraplacental yolk sac in maternal-fetal calcium exchange. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E721-32.
- KREBS, J., VASAK, M., SCARPA, A. & CARAFOLI, E. (1987) Conformational differences between the E1 and E2 states of the calcium adenosinetriphosphatase of the erythrocyte plasma membrane as revealed by circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 26, 3921-6.
- KUMAR, S., MCDONNELL, P. C., GUM, R. J., HAND, A. T., LEE, J. C. & YOUNG, P. R. (1997) Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*, 235, 533-8.
- KYRIAKIS, J. M., BANERJEE, P., NIKOLAKAKI, E., DAI, T., RUBIE, E. A., AHMAD, M. F., AVRUCH, J. & WOODGETT, J. R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature*, 369, 156-60.
- LACROIX, M. C., GUIBOURDENCHE, J., FRENDON, J. L., MULLER, F. & EVAIN-BRION, D. (2002) Human placental growth hormone--a review. *Placenta*, 23 Suppl A, S87-94.
- LAFOND, J., AUGER, D., FORTIER, J. & BRUNETTE, M. G. (1988) Parathyroid hormone receptor in human placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes. *Endocrinology*, 123, 2834-40.
- LAFOND, J., LECLERC, M. & BRUNETTE, M. G. (1991) Characterization of calcium transport by basal plasma membranes from human placental syncytiotrophoblast. *J Cell Physiol*, 148, 17-23.

- LAFOND, J., GOYER-O'REILLY, I., LARAMEE, M. & SIMONEAU, L. (2001) Hormonal regulation and implication of cell signaling in calcium transfer by placenta. *Endocrine*, 14, 285-94.
- LAMBERS, T. T., WEIDEMA, A. F., NILIUS, B., HOENDEROP, J. G. & BINDELS, R. J. (2004) Regulation of the mouse epithelial Ca^{2+} channel TRPV6 by the Ca^{2+} -sensor calmodulin. *J Biol Chem*, 279, 28855-61.
- LARAMEE, M., SIMONEAU, L. & LAFOND, J. (2002) Phospholipase C axis is the preferential pathway leading to PKC activation following PTH or PTHrP stimulation in human term placenta. *Life Sci*, 72, 215-25.
- LECHNER, C., ZAHALKA, M. A., GIOT, J. F., MOLLER, N. P. & ULLRICH, A. (1996) ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 4355-9.
- LEE, H., HSU, S., WINAWER, S. & FRIEDMAN, E. (1993) Signal transduction through extracellular signal-regulated kinase-like pp57 blocked in differentiated colon carcinoma cells having low levels of c-src kinase. *J Biol Chem*, 268, 8181-7.
- LEE, J. C., LAYDON, J. T., MCDONNELL, P. C., GALLAGHER, T. F., KUMAR, S., GREEN, D., MCNULTY, D., BLUMENTHAL, M. J., HEYS, J. R., LANDVATTER, S. W. & ET AL. (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372, 739-46.
- LEE, J. D., ULEVITCH, R. J. & HAN, J. (1995a) Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 213, 715-24.
- LEE, K., DEEDS, J. D. & SEGRE, G. V. (1995b) Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology*, 136, 453-63.
- LEWIN, E., ALMADEN, Y., RODRIGUEZ, M. & OLGAARD, K. (2000) PTHrP enhances the secretory response of PTH to a hypocalcemic stimulus in rat parathyroid glands. *Kidney Int*, 58, 71-81.
- LEWIS, T. S., SHAPIRO, P. S. & AHN, N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 74, 49-139.
- LI, F., ZHANG, D. & FUJISE, K. (2001) Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem*, 276, 47542-9.
- LI, H. Y., SHEN, J. T., CHANG, S. P., HSU, W. L. & SUNG, Y. J. (2008) Calcitonin promotes outgrowth of trophoblast cells on endometrial epithelial cells: involvement of calcium mobilization and protein kinase C activation. *Placenta*, 29, 20-9.
- LI, N., BATZER, A., DALY, R., YAJNIK, V., SKOLNIK, E., CHARDIN, P., BAR-SAGI, D., MARGOLIS, B. & SCHLESSINGER, J. (1993) Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature*, 363, 85-8.
- LI, Z., MATSUOKA, S., HRYSHKO, L. V., NICOLL, D. A., BERSOHN, M. M., BURKE, E. P., LIFTON, R. P. & PHILIPSON, K. D. (1994) Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *J Biol Chem*, 269, 17434-9.
- LI, Z., JIANG, Y., ULEVITCH, R. J. & HAN, J. (1996) The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 228, 334-40.

- LINCK, B., QIU, Z., HE, Z., TONG, Q., HILGEMANN, D. W. & PHILIPSON, K. D. (1998) Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *Am J Physiol*, 274, C415-23.
- LOMRI, N., PERRET, C., GOUHIER, N. & THOMASSET, M. (1989) Cloning and analysis of calbindin-D28K cDNA and its expression in the central nervous system. *Gene*, 80, 87-98.
- MACDONALD, S. M., RAFNAR, T., LANGDON, J. & LICHTENSTEIN, L. M. (1995) Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*, 269, 688-90.
- MACGILL, K., MOSELEY, J. M., MARTIN, T. J., BRENNECKE, S. P., RICE, G. E. & WLODEK, M. E. (1997) Vascular effects of PTHrP (1-34) and PTH (1-34) in the human fetal-placental circulation. *Placenta*, 18, 587-92.
- MACMANUS, J. P., WATSON, D. C. & YAGUCHI, M. (1986) The purification and complete amino acid sequence of the 9000-Mr Ca²⁺-binding protein from rat placenta. Identity with the vitamin D-dependent intestinal Ca²⁺-binding protein. *Biochem J*, 235, 585-95.
- MAIOLI, E., FORTINO, V., TORRICELLI, C., AREZZINI, B. & GARDI, C. (2002) Effect of parathyroid hormone-related protein on fibroblast proliferation and collagen metabolism in human skin. *Exp Dermatol*, 11, 302-10.
- MALASSINE, A., TARRADE, A., GUIBOURDENCHE, J., ROCHETTE-EGLY, C. & EVAÏN-BRION, D. (2000) Le placenta. *M/S*, 16, 329-35.
- MANNSTADT, M., JUPPNER, H. & GARDELLA, T. J. (1999) Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol*, 277, F665-75.
- MARIEB, E. N., 2005. *Anatomie et physiologie humaine*, 3^e édition, Saint-Laurent (Qué) : Renouveau pédagogique, 1288 p.
- MCKINNON, T., CHAKRABORTY, C., GLEESON, L. M., CHIDIAC, P. & LALA, P. K. (2001) Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 3665-74.
- MCKINSEY, T. A. & OLSON, E. N. (1999) Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev*, 9, 267-74.
- MI, S., LEE, X., LI, X., VELDMAN, G. M., FINNERTY, H., RACIE, L., LAVALLIE, E., TANG, X. Y., EDOUARD, P., HOWES, S., KEITH, J. C., JR. & MCCOY, J. M. (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403, 785-9.
- MIAO, D., LI, J., XUE, Y., SU, H., KARAPLIS, A. C. & GOLTZMAN, D. (2004) Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology*, 145, 3554-62.
- MOODIE, S. A., WILLUMSEN, B. M., WEBER, M. J. & WOLFMAN, A. (1993) Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, 260, 1658-61.
- MOREAU, R., DAOUD, G., BERNATCHEZ, R., SIMONEAU, L., MASSE, A. & LAFOND, J. (2002a) Calcium uptake and calcium transporter expression by trophoblast cells from human term placenta. *Biochim Biophys Acta*, 1564, 325-32.

- MOREAU, R., HAMEL, A., DAOUD, G., SIMONEAU, L. & LAFOND, J. (2002b) Expression of calcium channels along the differentiation of cultured trophoblast cells from human term placenta. *Biol Reprod*, 67, 1473-9.
- MOREAU, R., DAOUD, G., MASSE, A., SIMONEAU, L. & LAFOND, J. (2003) Expression and role of calcium-ATPase pump and sodium-calcium exchanger in differentiated trophoblasts from human term placenta. *Mol Reprod Dev*, 65, 283-8.
- MORGAN, G., WOODING, F. B., CARE, A. D. & JONES, G. V. (1997) Genetic regulation of placental function: a quantitative in situ hybridization study of calcium binding protein (calbindin-D9k) and calcium ATPase mRNAs in sheep placenta. *Placenta*, 18, 211-8.
- MOROOKA, T. & NISHIDA, E. (1998) Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells. *J Biol Chem*, 273, 24285-8.
- MORRISH, D. W., BHARDWAJ, D., DABBAGH, L. K., MARUSYK, H. & SIY, O. (1987) Epidermal growth factor induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 65, 1282-90.
- MORRISH, D. W., DAKOUR, J., LI, H., XIAO, J., MILLER, R., SHERBURNE, R., BERDAN, R. C. & GUILBERT, L. J. (1997) In vitro cultured human term cytotrophoblast: a model for normal primary epithelial cells demonstrating a spontaneous differentiation programme that requires EGF for extensive development of syncytium. *Placenta*, 18, 577-85.
- MORRISON, D. K. & CUTLER, R. E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 174-9.
- MULLER, D., HOENDEROP, J. G., MEIJ, I. C., VAN DEN HEUVEL, L. P., KNOERS, N. V., DEN HOLLANDER, A. I., EGGERT, P., GARCIA-NIETO, V., CLAVERIE-MARTIN, F. & BINDELS, R. J. (2000a) Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1). *Genomics*, 67, 48-53.
- MULLER, D., HOENDEROP, J. G., MERKX, G. F., VAN OS, C. H. & BINDELS, R. J. (2000b) Gene structure and chromosomal mapping of human epithelial calcium channel. *Biochem Biophys Res Commun*, 275, 47-52.
- NAGATA, Y., TAKAHASHI, N., DAVIS, R. J. & TODOKORO, K. (1998) Activation of p38 MAP kinase and JNK but not ERK is required for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Blood*, 92, 1859-69.
- NAKAMURA, K., SHIRAI, T., MORISHITA, S., UCHIDA, S., SAEKI-MIURA, K. & MAKISHIMA, F. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res*, 250, 351-63.
- NAKIELNY, S., COHEN, P., WU, J. & STURGILL, T. (1992) MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *Embo J*, 11, 2123-9.
- NEWHOUSE, S. M., DAVIDGE, S. T., WINKLER-LOWEN, B., DEMIANCZUK, N. & GUILBERT, L. J. (2007) In vitro differentiation of villous trophoblasts from pregnancies complicated by intrauterine growth restriction with and without pre-eclampsia. *Placenta*, 28, 999-1003.

- NICOLL, D. A., LONGONI, S. & PHILIPSON, K. D. (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *Science*, 250, 562-5.
- NICOLL, D. A., QUEDNAU, B. D., QUI, Z., XIA, Y. R., LUSIS, A. J. & PHILIPSON, K. D. (1996) Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem*, 271, 24914-21.
- NIEMEYER, B. A., BERGS, C., WISSENBAACH, U., FLOCKERZI, V. & TROST, C. (2001) Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3600-5.
- OHARA, N. (2001) Calcium metabolism in pregnancy: disturbed calcium homeostasis in diabetic pregnancy and preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 28, 133-41.
- PAWSON, T. & SCOTT, J. D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, 278, 2075-80.
- PAYNE, D. M., ROSSOMANDO, A. J., MARTINO, P., ERICKSON, A. K., HER, J. H., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., WEBER, M. J. & STURGILL, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J*, 10, 885-92.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS GIBSON, T., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. & COBB, M. H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22, 153-83.
- PENG, J. B., CHEN, X. Z., BERGER, U. V., VASSILEV, P. M., BROWN, E. M. & HEDIGER, M. A. (2000) A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J Biol Chem*, 275, 28186-94.
- PENG, J. B., CHEN, X. Z., BERGER, U. V., VASSILEV, P. M., TSUKAGUCHI, H., BROWN, E. M. & HEDIGER, M. A. (1999) Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem*, 274, 22739-46.
- PENG, J. B., BROWN, E. M. & HEDIGER, M. A. (2001) Structural conservation of the genes encoding CaT1, CaT2, and related cation channels. *Genomics*, 76, 99-109.
- PERRET, C., LOMRI, N., GOUIER, N., AUFRAY, C. & THOMASSET, M. (1988) The rat vitamin-D-dependent calcium-binding protein (9-kDa CaBP) gene. Complete nucleotide sequence and structural organization. *Eur J Biochem*, 172, 43-51.
- PETRAGLIA, F., FLORIO, P., NAPPI, C. & GENAZZANI, A. R. (1996) Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. *Endocr Rev*, 17, 156-86.
- RAIJMAKERS, M. T., DECHEND, R. & POSTON, L. (2004) Oxidative stress and preeclampsia: rationale for antioxidant clinical trials. *Hypertension*, 44, 374-80.
- RANKIN, W., GRILL, V. & MARTIN, T. J. (1997) Parathyroid hormone-related protein and hypercalcemia. *Cancer*, 80, 1564-71.
- RAO, K. V., CHEN, L., GNANASEKAR, M. & RAMASWAMY, K. (2002) Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*, 277, 31207-13.
- RAY, L. B. & STURGILL, T. W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 1502-6.
- REDMAN, C. W. (1997) Cytotrophoblasts: masters of disguise. *Nat Med*, 3, 610-1.

- REDMAN, C. W. & SARGENT, I. L. (2000) Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*, 21, 597-602.
- REDMAN, C. W. & SARGENT, I. L. (2001) The pathogenesis of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Fertil*, 29, 518-22.
- REINHARDT, T. A., FILOTEO, A. G., PENNISTON, J. T. & HORST, R. L. (2000) Ca(2+)-ATPase protein expression in mammary tissue. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C1595-602.
- RITCHIE, L. D. & KING, J. C. (2000) Dietary calcium and pregnancy-induced hypertension: is there a relation? *Am J Clin Nutr*, 71, 1371S-4S.
- ROBBINS, D. J. & COBB, M. H. (1992) Extracellular signal-regulated kinases 2 autophosphorylates on a subset of peptides phosphorylated in intact cells in response to insulin and nerve growth factor: analysis by peptide mapping. *Mol Biol Cell*, 3, 299-308.
- ROBBINS, D. J., ZHEN, E., OWAKI, H., VANDERBILT, C. A., EBERT, D., GEPPERT, T. D. & COBB, M. H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem*, 268, 5097-106.
- SAITO, S., SAITO, M., ENOMOTO, M., ITO, A., MOTOYOSHI, K., NAKAGAWA, T. & ICHIJO, M. (1993) Human macrophage colony-stimulating factor induces the differentiation of trophoblast. *Growth Factors*, 9, 11-9.
- SALLE, B. L., SENTERRE, J., GLORIEUX, F. H., DELVIN, E. E. & PUTET, G. (1987) Vitamin D metabolism in preterm infants. *Biol Neonate*, 52 Suppl 1, 119-30.
- SANCHEZ, J. C., SCHALLER, D., RAVIER, F., GOLAZ, O., JACCOUD, S., BELET, M., WILKINS, M. R., JAMES, R., DESHUSSES, J. & HOCHSTRASSER, D. (1997) Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis*, 18, 150-5.
- SEGER, R., AHN, N. G., BOULTON, T. G., YANCOPOULOS, G. D., PANAYOTATOS, N., RADZIEJEWSKA, E., ERICSSON, L., BRATLIEN, R. L., COBB, M. H. & KREBS, E. G. (1991) Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo autophosphorylation on both tyrosine and threonine residues: implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6142-6.
- SEGER, R., AHN, N. G., POSADA, J., MUNAR, E. S., JENSEN, A. M., COOPER, J. A., COBB, M. H. & KREBS, E. G. (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem*, 267, 14373-81.
- SENARIS, R., GARCIA-CABALLERO, T., CASABIELL, X., GALLEGU, R., CASTRO, R., CONSIDINE, R. V., DIEGUEZ, C. & CASANUEVA, F. F. (1997) Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, 138, 4501-4.
- SHI, Q. J., LEI, Z. M., RAO, C. V. & LIN, J. (1993) Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*, 132, 1387-95.
- SHIEH, B. H., XIA, Y., SPARKES, R. S., KLISAK, I., LUSIS, A. J., NICOLL, D. A. & PHILIPSON, K. D. (1992) Mapping of the gene for the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca2+ exchanger to human chromosome 2p21-p23. *Genomics*, 12, 616-7.
- SMALLWOOD, J. I., GUGI, B. & RASMUSSEN, H. (1988) Regulation of erythrocyte Ca2+ pump activity by protein kinase C. *J Biol Chem*, 263, 2195-202.

- STAUFFER, T. P., HILFIKER, H., CARAFOLI, E. & STREHLER, E. E. (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem*, 268, 25993-6003.
- STAUFFER, T. P., GUERINI, D. & CARAFOLI, E. (1995) Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A study using specific antibodies. *J Biol Chem*, 270, 12184-90.
- STEIN, B., BRADY, H., YANG, M. X., YOUNG, D. B. & BARBOSA, M. S. (1996) Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem*, 271, 11427-33.
- STEIN, B., YANG, M. X., YOUNG, D. B., JANKNECHT, R., HUNTER, T., MURRAY, B. W. & BARBOSA, M. S. (1997) p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem*, 272, 19509-17.
- STRID, H. & POWELL, T. L. (2000) ATP-dependent Ca^{2+} transport is up-regulated during third trimester in human syncytiotrophoblast basal membranes. *Pediatr Res*, 48, 58-63.
- STRID, H., CARE, A., JANSSON, T. & POWELL, T. (2002) Parathyroid hormone-related peptide (38-94) amide stimulates ATP-dependent calcium transport in the Basal plasma membrane of the human syncytiotrophoblast. *J Endocrinol*, 175, 517-24.
- STRID, H., BUCHT, E., JANSSON, T., WENNERGREN, M. & POWELL, T. L. (2003) ATP dependent Ca^{2+} transport across basal membrane of human syncytiotrophoblast in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction or diabetes. *Placenta*, 24, 445-52.
- STULC, J., STULCOVA, B., SMID, M. & SACH, I. (1994) Parallel mechanisms of Ca^{++} transfer across the perfused human placental cotyledon. *Am J Obstet Gynecol*, 170, 162-7.
- THAW, P., BAXTER, N. J., HOUNSLOW, A. M., PRICE, C., WALTHO, J. P. & CRAVEN, C. J. (2001) Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol*, 8, 701-4.
- THIEDE, M. A. & RODAN, G. A. (1988) Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science*, 242, 278-80.
- THIEDE, M. A., DAIFOTIS, A. G., WEIR, E. C., BRINES, M. L., BURTIS, W. J., IKEDA, K., DREYER, B. E., GARFIELD, R. E. & BROADUS, A. E. (1990) Intrauterine occupancy controls expression of the parathyroid hormone-related peptide gene in preterm rat myometrium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6969-73.
- THIELE, H., BERGER, M., SKALWEIT, A. & THIELE, B. J. (2000) Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *Eur J Biochem*, 267, 5473-81.
- THOMAS, G. & THOMAS, G. (1986) Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins. *J Cell Biol*, 103, 2137-44.
- THOMASSET, M., PARKES, C. O. & CUISINIER-GLEIZES, P. (1982) Rat calcium-binding proteins: distribution, development, and vitamin D dependence. *Am J Physiol*, 243, E483-8.
- TJOA, M. L., OUDEJANS, C. B., VAN VUGT, J. M., BLANKENSTEIN, M. A. & VAN WIJK, I. J. (2004) Markers for presymptomatic prediction of preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Hypertens Pregnancy*, 23, 171-89.

- TUAN, R. S. (1985) Ca²⁺-binding protein of the human placenta. Characterization, immunohistochemical localization and functional involvement in Ca²⁺ transport. *Biochem J*, 227, 317-26.
- UCHIDA, M., SHIMA, M., CHIKAZU, D., FUJIEDA, A., OBARA, K., SUZUKI, H., NAGAI, Y., YAMATO, H. & KAWAGUCHI, H. (2001) Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 16, 221-30.
- VAN ABEL, M., HOENDEROP, J. G., DARDENNE, O., ST ARNAUD, R., VAN OS, C. H., VAN LEEUWEN, H. J. & BINDELS, R. J. (2002) 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-independent stimulatory effect of estrogen on the expression of ECaC1 in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 13, 2102-9.
- VAN ABEL, M., HOENDEROP, J. G., VAN DER KEMP, A. W., FRIEDLAENDER, M. M., VAN LEEUWEN, J. P. & BINDELS, R. J. (2005) Coordinated control of renal Ca(2+) transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int*, 68, 1708-21.
- VAN CROMPHAUT, S. J., DEWERCHIN, M., HOENDEROP, J. G., STOCKMANS, I., VAN HERCK, E., KATO, S., BINDELS, R. J., COLLEN, D., CARMELIET, P., BOUILLON, R. & CARMELIET, G. (2001) Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13324-9.
- VOETS, T., PRENEN, J., FLEIG, A., VENNEKENS, R., WATANABE, H., HOENDEROP, J. G., BINDELS, R. J., DROOGMANS, G., PENNER, R. & NILIUS, B. (2001) CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem*, 276, 47767-70.
- VOJTEK, A. B., HOLLENBERG, S. M. & COOPER, J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, 74, 205-14.
- WANG, Y., HUANG, S., SAH, V. P., ROSS, J., JR., BROWN, J. H., HAN, J. & CHIEN, K. R. (1998) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*, 273, 2161-8.
- WARNE, P. H., VICIANA, P. R. & DOWNWARD, J. (1993) Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*, 364, 352-5.
- WASKIEWICZ, A. J., FLYNN, A., PROUD, C. G. & COOPER, J. A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *Embo J*, 16, 1909-20.
- WILLIAMS, J. M., ABRAMOVICH, D. R., DACKER, C. G., MAYHEW, T. M. & PAGE, K. R. (1991) Inhibitor action on placental calcium transport. *Calcif Tissue Int*, 48, 7-12.
- WOOD, R. J., TCHACK, L. & TAPARIA, S. (2001) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases the expression of the CaT1 epithelial calcium channel in the Caco-2 human intestinal cell line. *BMC Physiol*, 1, 11.
- WU, J., HARRISON, J. K., VINCENT, L. A., HAYSTEAD, C., HAYSTEAD, T. A., MICHEL, H., HUNT, D. F., LYNCH, K. R. & STURGILL, T. W. (1993) Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 173-7.
- WU, T. L., VASAVADA, R. C., YANG, K., MASSFELDER, T., GANZ, M., ABBAS, S. K., CARE, A. D. & STEWART, A. F. (1996) Structural and physiologic characterization

- of the mid-region secretory species of parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem*, 271, 24371-81.
- WU, Z., WOODRING, P. J., BHAKTA, K. S., TAMURA, K., WEN, F., FERAMISCO, J. R., KARIN, M., WANG, J. Y. & PURI, P. L. (2000) p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol*, 20, 3951-64.
- XU, A., BELLAMY, A. R. & TAYLOR, J. A. (1999) Expression of translationally controlled tumour protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem J*, 342 Pt 3, 683-9.
- YAMAMOTO, M., HARM, S. C., GRASSER, W. A. & THIEDE, M. A. (1992) Parathyroid hormone-related protein in the rat urinary bladder: a smooth muscle relaxant produced locally in response to mechanical stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5326-30.
- ZETSER, A., GREDINGER, E. & BENGAL, E. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem*, 274, 5193-200.
- ZHANG, J., ZHANG, F., EBERT, D., COBB, M. H. & GOLDSMITH, E. J. (1995) Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure*, 3, 299-307.
- ZHANG, X. F., SETTLEMAN, J., KYRIAKIS, J. M., TAKEUCHI-SUZUKI, E., ELLEDGE, S. J., MARSHALL, M. S., BRUDER, J. T., RAPP, U. R. & AVRUCH, J. (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, 364, 308-13.
- ZHENG, C. F. & GUAN, K. L. (1993) Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase. *J Biol Chem*, 268, 16116-9.
- ZHOU, G., BAO, Z. Q. & DIXON, J. E. (1995) Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 270, 12665-9.
- ZHOU, Y., DAMSKY, C. H., CHIU, K., ROBERTS, J. M. & FISHER, S. J. (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest*, 91, 950-60.
- ZHOU, Y., DAMSKY, C. H. & FISHER, S. J. (1997) Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest*, 99, 2152-64.
- ZHU, A. X., ZHAO, Y., MOLLER, D. E. & FLIER, J. S. (1994) Cloning and characterization of p97MAPK, a novel human homolog of rat ERK-3. *Mol Cell Biol*, 14, 8202-11.
- ZOCCOLA, D., TAMBUTTE, E., KULHANEK, E., PUVEREL, S., SCIMECA, J. C., ALLEMAND, D. & TAMBUTTE, S. (2004) Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochim Biophys Acta*, 1663, 117-26.
- ZYLINSKA, L., KAWECKA, I., LACHOWICZ, L. & SZEMRAJ, J. (2002) The isoform- and location-dependence of the functioning of the plasma membrane calcium pump. *Cell Mol Biol Lett*, 7, 1037-45.